

Universidad Autónoma de Madrid

Departamento de Bioquímica

**Papel del complejo IV en la expansión del tejido
adiposo blanco asociada a la edad.**

Inés Soro Arnáiz

Madrid, 2015

Departamento de Bioquímica
Facultad de Medicina
Universidad Autónoma de Madrid

**Papel del complejo IV en la expansión del tejido
adiposo blanco asociada a la edad.**

Inés Soro Arnáiz
Licenciada en Bioquímica

Director de Tesis: Dr. Julián Aragonés López
Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Universitario de
la Princesa, Madrid



El trabajo recogido en la presente memoria ha sido realizado por Inés Soro Arnáiz, bajo la dirección del Dr. Julián Aragonés López en el Instituto de Investigación Sanitaria Hospital Universitario de la Princesa

Opta al grado de Doctor

Inés Soro Arnáiz

VºBº del Director de Tesis

Dr. Julián Aragonés López

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

RESUMEN

El envejecimiento se ha asociado con la expansión del tejido adiposo blanco (WAT) así como con la disfunción mitocondrial, sin embargo los mecanismos moleculares implicados en ambos procesos se desconocen. Además, la mayoría de los estudios relacionados con la obesidad se han llevado a cabo empleando modelos de dieta rica en grasa (HFD) los cuales son mucho más exacerbados que la obesidad alcanzada durante el envejecimiento. En este trabajo demostramos que la expresión y actividad del complejo IV mitocondrial se reducen en los adipocitos blancos durante el envejecimiento, mientras que los niveles de expresión de otros marcadores mitocondriales no se alteran de manera significativa. En particular, mostramos que esta desestabilización del complejo IV durante el envejecimiento se inicia por un efecto primario del factor inducible por hipoxia 1 alfa (HIF1A) sobre la subunidad Vb del complejo IV (COX5B). Esta represión implica un sitio de unión canónico de c-MYC que se encuentra en el promotor de *Cox5b*, mientras que no está presente en el resto de subunidades del complejo IV. Así, hemos demostrado que c-MYC se une específicamente al promotor proximal de *Cox5b* y que esta unión disminuye notablemente en condiciones de hipoxia, asociadas a la estabilización de HIF1A. En cuanto a las consecuencias biológicas de la represión de COX5B, mostramos que el silenciamiento de COX5B *in vitro* promueve la desestabilización y reducción en la actividad del complejo IV, lo que promueve una disminución en la oxidación de ácidos grasos y una mayor acumulación de lípidos intracelulares. En este sentido, el silenciamiento de COX5B *in vivo* en WAT de ratones jóvenes aumenta el tamaño de los adipocitos, mientras que la restauración de la expresión COX5B en adipocitos de ratones envejecidos, contrarresta la expansión del WAT asociada a la edad. Por último, mostramos que la reducción en la expresión de COX5B dependiente de la edad también tiene lugar en humanos y que los niveles de expresión de esta subunidad pueden servir como marcador pronóstico para la respuesta a tratamientos de cirugía bariátrica en pacientes obesos. Nuestros hallazgos demuestran el papel central del complejo IV en general, y de COX5B en particular, durante la expansión de WAT asociada a la edad y que el restablecimiento de los niveles de expresión de COX5B en adipocitos envejecidos puede contrarrestar la expansión del WAT durante el envejecimiento.

ABSTRACT

Aging is associated with white adipose tissue (WAT) enlargement and mitochondrial dysfunction but the molecular mechanisms involved are poorly understood. Moreover, most of the knowledge about obesity has been derived from studies using HFD conditions which are more severe than those associated to age-dependent WAT expansion. Here we show that mitochondrial complex IV expression and activity are reduced in white adipocytes during aging while other mitochondrial markers and mitochondrial content remain unchanged. This *Cox5b* repression is driven by oxygen sensing pathways and involves a canonical c-MYC binding site located at the *Cox5b* proximal promoter is not found in other complex IV subunits. Here we demonstrate that c-MYC binds specifically to the *Cox5b* proximal promoter and its binding is markedly repressed under hypoxia conditions, probably in a HIF1A dependent manner. COX5B knock down *in vitro* leads to a reduction in complex IV assembly and activity which favors a lower fatty acid oxidation and intracellular lipid accumulation. Local *in vivo* COX5B silencing in WAT of young mice increased adipocyte size, while restoration of COX5B expression in aging mice counteracted adipocyte size enlargement. Furthermore, age-dependent reduction of *COX5B* gene expression was also found in human WAT and COX5B expression levels could predict long-term weight loss after bariatric surgery treatment in obese patients. Our findings show a pivotal role of complex IV in white adipocyte enlargement and that restoration of COX5B expression prevents age-dependent WAT expansion.

ÍNDICE

ABREVIATURAS	1
1. INTRODUCCIÓN	5
1.1. TEJIDO ADIPOSEO BLANCO	7
1.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES	7
1.1.2. EXPANSIÓN DEL TEJIDO ADIPOSEO BLANCO	8
1.2. OBESIDAD	10
1.2.1. EPIDEMIOLOGÍA	10
1.2.2. REMODELACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSEO BLANCO	10
1.3. MITOCONDRIA	12
1.3.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA MITOCONDRIA	12
1.3.2. PAPEL DE LA MITOCONDRIA EN EL TEJIDO ADIPOSEO BLANCO	14
1.3.3. DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL Y OBESIDAD	16
1.3.4. SISTEMA DE FOSFORILACIÓN OXIDATIVA (OXPHOS)	17
1.4. EL OXÍGENO Y LA RESPUESTA A HIPOXIA	19
1.4.1. LA RESPUESTA A HIPOXIA	19
1.4.2. RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL INDUCIDA POR HIF α	21
1.4.3. PAPEL DE HIF EN LA EXPANSIÓN DEL TEJIDO ADIPOSEO BLANCO	22
2. OBJETIVOS	25
3. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1. LÍNEAS CELULARES	31
3.2. TRASDUCCIÓN LENTIVIRAL DE LÍNEAS CELULARES	31
3.3. ANÁLISIS DE ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS MEDIANTE TINCIÓN CON ROJO NILO	32
3.4. ENSAYO DE ACTIVIDAD DEL COMPLEJO IV.	32
3.5. ELECTROFORESIS EN CONDICIONES NATIVAS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (BN-PAGE)	33
3.6. ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP).	33
3.7. MODELOS ANIMALES	35

3.8.	INYECCIÓN DE PARTÍCULAS LENTIVIRALES <i>IN VIVO</i> .	36
3.9.	ANÁLISIS HISTOLÓGICO.	36
3.10.	ASLAMIENTO DE ADIPOCITOS BLANCOS.	36
3.11.	CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO MITOCONDRIAL EN ADIPOCITOS.	37
3.12.	EXTRACCIÓN DE RNA Y PCR EN TIEMPO REAL.	37
3.13.	INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT.	38
3.14.	MUESTRAS DE TEJIDO ADIPOSO HUMANO.	39
3.15.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	40
4.	RESULTADOS.	41
4.1.	CAMBIOS MOLECULARES EN EL WAT ASOCIADOS A LA EDAD.	43
4.1.1.	GANANCIA DE PESO ASOCIADA A LA EDAD.	43
4.1.2.	CAMBIOS MOLECULARES ASOCIADOS A LA EXPANSIÓN DEL eWAT	44
4.2.	PAPEL DE HIF1A EN LA REPROGRAMACIÓN MITOCONDRIAL ASOCIADA A LA EDAD.	47
4.2.1.	HIF1A SE ESTABILIZA EN EL eWAT DURANTE LA GANANCIA DE PESO ASOCIADA A LA EDAD	47
4.2.2.	MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DEL PAPEL DE HIF1A EN LA GANANCIA DE PESO ASOCIADA A LA EDAD	48
4.2.3.	LOS RATONES DEFICIENTES PARA <i>Hif1a</i> SON RESISTENTES A LA GANANCIA DE PESO ASOCIADA A LA EDAD	50
4.2.4.	LA AUSENCIA DE <i>Hif1a</i> ESPECÍFICAMENTE EN ADIPOCITOS PREVIENE LA GANANCIA DE PESO ASOCIADA A LA EDAD.	52
4.2.5.	LA DELECCIÓN DE <i>Hif1a</i> PREVIENE LA REPRESIÓN DEL COMPLEJO IV EN RATONES ENVEJECIDOS.	53
4.2.6.	HIF1A REGULA LA EXPRESIÓN DE COX5B VIA c-MYC.	54
4.3.	EFFECTOS FUNCIONALES DEL SILENCIAMIENTO DE COX5B <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> .	57
4.3.1.	EL SILENCIAMIENTO DE <i>Cox5b</i> <i>IN VITRO</i> ES SUFICIENTE PARA DISMINUIR LA CANTIDAD Y ACTIVIDAD DEL COMPLEJO IV.	57

4.3.2.	EL SILENCIAMIENTO DE <i>Cox5b</i> <i>IN VITRO</i> DISMINUYE LA OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS Y PROMUEVE LA ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS.....	60
4.3.3.	EFFECTOS FUNCIONALES DEL SILENCIAMIENTO DE <i>Cox5b</i> <i>IN VIVO</i>	61
4.4.	EFFECTOS FUNCIONALES DE LA SOBREEXPRESIÓN DE COX5B <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i>	65
4.4.1.	LA SOBREEXPRESIÓN DE COX5B <i>IN VITRO</i> ES SUFICIENTE PARA AUMENTAR LA CANTIDAD Y ACTIVIDAD DEL COMPLEJO IV.....	65
4.5.	COX5B COMO FACTOR PRONÓSTICO DE LA PÉRDIDA DE PESO EN PACIENTES OBESOS.....	68
5.	DISCUSIÓN	71
5.1.	COMPARATIVA DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES DE OBESIDAD	73
5.2.	DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL EN MODELOS DE OBESIDAD.....	76
5.3.	MODELOS GENÉTICOS DE MANIPULACIÓN DE COMPONENTES MITOCONDRIALES EN ADIPOCITOS <i>IN VIVO</i>	77
5.4.	ESTABILIZACIÓN DE HIF1A Y RESPUESTA A HIPOXIA EN EL WAT	79
5.5.	PAPEL DE HIF1A EN EL CONTROL DEL PESO	81
5.6.	PAPEL DE HIF1A SOBRE EL COMPLEJO IV.....	83
5.7.	POTENCIAL TERAPEUTICO DE COX5B EN PACIENTES OBESOS	85
5.8.	CONCLUSIONES FINALES	86
6.	CONCLUSIONES.....	89
7.	BIBLIOGRAFÍA	93
	ÍNDICE DE FIGURAS	113
	ANEXO I	117
	ANEXO II	121

ABREVIATURAS

Acetil-CoA: Acetil-Coenzima A.

ARNm: ARN mensajero.

BMI: del inglés *Body Mass Index*; índice de masa corporal.

ChIP: del inglés *Chromatin Immunoprecipitation*; inmunoprecipitación de cromatina.

COX: del inglés *Cytochrome C Oxidase*; citocromo c oxidasa.

db/db: ratones con una mutación en el gen del receptor de leptina en homocigosis

ETC: del inglés *Electron Transport Chain*, cadena de transporte electrónico.

GLUT: del inglés *Glucose Transporter*, transportador de glucosa.

HFD: del inglés *High Fat Diet*, dieta rica en grasa.

HIF: del inglés *Hipoxia Inducible Factor*, factor inducible por hipoxia

Hif1a^{ΔAdipo}: ratones *Hif1a^{floxed}*-Adiponectina-Cre-ER^{T2} tratados con tamoxifeno.

Hif1a^{ΔUbq}: ratones *Hif1a^{floxed}*-UBC-Cre-ER^{T2} tratados con tamoxifeno.

MEF: del inglés *Mouse Embryonic Fibroblasts*; fibroblastos embrionarios de ratón.

mitADN: ADN mitocondrial.

mt-Co1: del inglés *Mitochondrially Encoded Cytochrome C Oxidase I*; subunidad I de la citocromo c oxidasa codificada por el genoma mitocondrial.

NDUFA: del inglés *NADH Dehydrogenase 1 Alpha*; subcomplejo 1 alfa de la NADH deshidrogenasa

NRF1: *Nuclear Respiratory Factor 1*.

ob/ob: ratones con una mutación en el gen de la leptina en homocigosis

OXPHOS: del inglés *Oxidative Phosphorilation*; fosforilación oxidativa.

PDK: del inglés *Pyruvate dehydrogenase kinase*; piruvato deshidrogenasa quinasa.

PGC: del inglés *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator*, coactivador del receptor gamma activado por proliferación peroxisomal.

PHD: del inglés *Prolyl Hydroxylase Domain containing protein*; proteína que contiene un dominio prolil hidroxilasa.

PPAR: del inglés *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*.

ROS: del inglés *Reactive Oxygen Species*; especies reactivas de oxígeno

SAT: del inglés *Subcutaneous Adipose Tissue*; tejido adiposo subcutáneo.

SC: Super-Complejos.

SDH: del inglés *Succinate Dehydrogenase Complex*; complejo succinato deshidrogenasa.

SIRT: del inglés *Sirtuin*, sirtuina.

SOCS3: del inglés *Suppressor Of Cytokine Signaling 3*; supresor de señalización por citoquinas 3.

TAG: triacilglicerol.

Tamoxifeno: 4-hidroxi-tamoxifeno.

TCA: del inglés *Tricarboxylic Acid cycle*; ciclo de los ácidos tricarboxílicos.

TFAM: del inglés *Mitochondrial Transcription Factor*.

UQCRC1: del inglés *Ubiquinol-Cytochrome C Reductase Core Protein 1*; proteína nuclear 1 de la ubiquinol citocromo c reductasa

VAT: del inglés *Visceral Adipose Tissue*; tejido adiposo visceral.

VDAC1: del inglés *Voltage-dependent anion channel 1*; canal dependiente de la tensión de aniones 1.

VEGF: del inglés *Vascular Endothelial Growth Factor*, factor de crecimiento del endotelio vascular.

VHL: *von Hippel-Lindau*.

WAT: del inglés *White Adipose Tissue*; tejido adiposo blanco.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. TEJIDO ADIPOSO BLANCO

1.1.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES

El tejido adiposo blanco (WAT) es un tejido conectivo blando que está formado principalmente por adipocitos maduros (Gesta et al., 2007; Rosen and Spiegelman, 2014); aunque también forman parte de él preadipocitos, células vasculares, células nerviosas, células del sistema inmune y fibroblastos (Gesta et al., 2007; Lee et al., 2013). Los adipocitos blancos son células especializadas en el almacenamiento de energía en forma de grasa y se caracterizan por poseer una gran gota lipídica que ocupa la mayor parte de su citoplasma donde se almacena la energía fundamentalmente en forma de triacilgliceridos (TAGs).

Respecto a la función de este órgano, se considera que el WAT es el reservorio energético del organismo donde se almacena el exceso de nutrientes en forma de TAGs impidiendo que los lípidos se acumulen de forma ectópica en otros órganos causando disfunción de los mismos. Un ejemplo de ello son los ratones deficientes para PPAR γ de manera específica en el tejido adiposo, los cuales se caracterizan por ser lipodistróficos y resistentes a obesidad. Como consecuencia de la ausencia de WAT, desarrollan esteatosis hepática (acumulación de lípidos en el hígado) y resistencia hepática a la insulina debido a que aumentan los niveles de ácidos grasos circulantes que no pueden ser almacenados en los adipocitos (He et al., 2003; Jones et al., 2005). Al margen de esta función central del WAT, en los últimos años, se ha descrito que también juega un papel esencial en la homeostasis energética del organismo mediante la secreción de factores solubles al torrente sanguíneo que controlan la función metabólica de otros órganos (Rosen and Spiegelman, 2014; Trayhurn and Wood, 2004; Zhang et al., 1994). Estos factores solubles secretados (y sintetizados) por los adipocitos son conocidos como adipoquinas (Trayhurn and Wood, 2004), las cuales han sido relacionadas con numerosas funciones como el control del apetito, la sensibilidad a insulina, el metabolismo lipídico, etc. (Rosen and Spiegelman, 2006, 2014; Trayhurn and Wood, 2004). Una de las adipoquinas más estudiadas es la leptina que fue una de las primeras adipoquinas en ser identificada (Zhang et al., 1994) y su descubrimiento fue uno de los detonantes que llevó al actual interés por el tejido adiposo como órgano endocrino. La leptina es una hormona producida principalmente por los adipocitos y cuyos niveles circulantes están directamente relacionados con la expansión de tejido adiposo (Mendoza-Nunez et al., 2002; Zhang et al., 1994). Su función principal es la disminución de la ingesta y el aumento del gasto energético (Campfield et al., 1995). Otra de las

adipoquinas mas estudiadas es la adiponectina, la cual también es secretada mayoritariamente por los adipocitos, pero a diferencia de la leptina su expresión se ve disminuida durante la expansión del WAT (Kern et al., 2003; Koh et al., 2007; Scherer, 2006). La adiponectina juega un papel fundamental en la mejora de la sensibilidad a insulina, en el aumento del metabolismo de ácidos grasos y en el buen funcionamiento de la mitocondria del propio adipocito blanco (Asterholm and Scherer, 2010; Kusminski and Scherer, 2009). Debido a estas, y a otras funciones llevadas a cabo por las hormonas secretadas por los adipocitos, el WAT se ha revelado como un componente esencial en la regulación del balance energético y la homeostasis de nutrientes (Rosen and Spiegelman, 2006, 2014). Por otra parte, el WAT también juega un papel esencial en la protección de determinados órganos, como por ejemplo el ojo, que está recubierto por una capa protectora de grasa o, en otras localizaciones anatómicas, protegiendo contra daño por rozamiento mecánico. Además, se ha descrito su capacidad de aislamiento en el caso de los mamíferos acuáticos (Rosen and Spiegelman, 2014).

Por último, otra de las características especiales del WAT es que es un tejido que se distribuye por todo el cuerpo en acúmulos con diferentes localizaciones anatómicas. Además, se ha demostrado, que los depósitos de grasa presentan características diferentes en función de su localización. Así, el tejido adiposo subcutáneo presenta una capacidad oxidativa mayor y forma parte de la respuesta termogénica a la exposición a frío (Cohen et al., 2014; Vitali et al., 2012; Wu et al., 2013). Por el contrario, el tejido adiposo visceral tiene una capacidad oxidativa mucho menor y su expansión se le ha relacionado con el desarrollo de enfermedades metabólicas (mientras que esta asociación no tiene lugar con el tejido adiposo subcutáneo) (Lee et al., 2013; Rosen and Spiegelman, 2014; Sackmann-Sala et al., 2012). Aunque se han estudiado menos, también existen pequeños depósitos de tejido adiposo blanco en otras localizaciones anatómicas, como por ejemplo el tejido adiposo epicárdico o el tejido adiposo renal, que debido a su pequeño tamaño no tienen efectos a nivel sistémico pero juegan un papel importante a nivel local (Karastergiou and Fried, 2013). Por ejemplo, un incremento en la grasa epicárdica se ha relacionado con un aumento en el resigo cardiovascular (Albuquerque et al., 2012; Nakanishi et al., 2011; Yerramasu et al., 2012).

1.1.2. EXPANSIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO BLANCO

El factor determinante para el inicio de la expansión del WAT es el balance energético, el cual viene determinado por la diferencia entre la energía ingerida y la energía gastada (Spiegelman and Flier, 2001). Cuando la energía ingerida es mayor que la gastada, el exceso energético es almacenado en el WAT en forma de TAGs y si este desbalance se

mantiene de forma prolongada se desarrollará la obesidad. La expansión del WAT puede tener lugar mediante un aumento en el número de adipocitos (hiperplasia) o por un aumento en el tamaño de los adipocitos ya existentes (hipertrofia) (Rosen and Spiegelman, 2014). Generalmente, la expansión del WAT inducida por un aumento en la ingesta tiene lugar por hipertrofia, ya que el tamaño de los adipocitos es muy sensible a la dieta (Donohoe et al., 2011). De esta manera, en condiciones de exceso de nutrientes, los adipocitos existentes aumentarán su tamaño hasta alcanzar su límite y, será entonces, cuando se inicie un proceso de reclutamiento de células precursoras que permitirán aumentar el número de adipocitos y continuar con la expansión del tejido (Kopecky et al., 2004; Krotkiewski et al., 1983; Rosen and Spiegelman, 2014). El aumento de tamaño de los adipocitos tiene lugar mediante un incremento en el contenido de TAG en el interior de la gota lipídica. Durante la síntesis de TAGs (esterificación de ácidos grasos) se unen tres ácidos grasos a una molécula de glicerol. Estos ácidos grasos pueden ser captados (i) directamente del torrente sanguíneo, donde son transportados en forma de ácidos grasos libres unidos a albúmina o bien en forma de TAG en quilomicrones o unidos a VLDL (de inglés *very low-density lipoprotein*) o bien (ii) ser sintetizados en el interior del propio adipocito a partir, generalmente, de glucosa mediante un proceso conocido como lipogénesis *de novo* (Lee et al., 2013; Proenca et al., 2014). En cuanto a la regulación de este proceso, la insulina es un importante promotor de la lipogénesis, puesto que además de favorecer la captación de glucosa, afecta a genes lipogénicos mediante la inducción del factor de transcripción SREBP1 (del inglés *Sterol regulatory element-binding protein*) (Bluher et al., 2002; Wong and Sul, 2010). Por el contrario, la leptina inhibe la lipogénesis ya que además de disminuir la ingesta, promueve la oxidación de ácidos grasos e inhibe genes implicados en la síntesis de los mismos (Oswal and Yeo, 2010) (Figura 2).

Por otra parte, además del aumento en el número y el tamaño de los adipocitos, otro factor importante para la expansión del tejido adiposo es la remodelación del mismo. Este proceso conlleva cambios en la matriz extracelular, generación de nuevos vasos y reclutamiento de células inflamatorias (Sun et al., 2011). En situación de obesidad, esta remodelación del WAT se ve incrementada lo cual tiene graves consecuencias como inflamación y disfunción del propio tejido (Hotamisligil et al., 1993) (ver siguiente apartado).

1.2. OBESIDAD

1.2.1. EPIDEMIOLOGÍA

La obesidad se ha convertido en la enfermedad del siglo XXI. Estudios recientes muestran cómo en los últimos años la prevalencia de la obesidad ha incrementado de manera considerable sobre todo en la población de mayor edad. De tal manera que, habiendo aumentado la esperanza de vida, la población mundial es cada vez más obesa (Marcellini et al., 2009; Ng et al., 2014; Ogden et al., 2013; van Harmelen et al., 2003). Las razones por las cuales el envejecimiento y la ganancia de peso cada vez van más de la mano se desconocen, pero se considera que hay varios factores que pueden influir como (i) predisposición genética, (ii) malos hábitos alimenticios y (iii) el sedentarismo. Recientemente se ha demostrado que existen cambios asociados a la edad que pueden explicar parte de esta relación, por ejemplo *Yang y colaboradores* han desvelado que las neuronas hipotalámicas positivas para proopiomelanocortina (o neuronas POMC), que están involucradas en el control del apetito, se van silenciando con la edad, de manera que existen cambios moleculares vinculados a la edad que pueden explicar la ganancia de peso asociada al envejecimiento (Yang et al., 2012). A pesar de la fuerte correlación que se ha demostrado que existe entre la obesidad y el envejecimiento (Marcellini et al., 2009; Ng et al., 2014; Ogden et al., 2013; van Harmelen et al., 2003), la mayoría de los estudios relacionados con la obesidad se han hecho empleando modelos animales de obesidad inducida por dieta en los que la expansión del tejido adiposo tiene lugar de forma mucho más rápida; de modo que, apenas se conocen los cambios moleculares que tiene lugar en los adipocitos durante la ganancia de peso asociada a la edad o en los primeros estadios del desarrollo de la obesidad (Sasaki, 2015).

1.2.2. REMODELACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO BLANCO

La habilidad que tiene el WAT para cambiar su tamaño en función de la demanda energética requiere una capacidad de remodelación excepcional. Los mecanismos específicos de remodelación del WAT han empezado a conocerse en los últimos años, pero la mayoría de los estudios se han realizado en modelos animales sometidos a dieta rica en grasa (HFD). Uno de los primeros eventos asociados a la remodelación del WAT durante su expansión inducida por dieta es la aparición de **hipoxia local** en el interior del WAT. Normalmente, la expansión del WAT tiene lugar por un aumento en el tamaño de los adipocitos; sin embargo, la hipertrofia no conlleva un aumento adecuado en la vascularización de forma paralela. Por este motivo, el WAT de animales alimentados

con HFD está vascularizado de manera deficiente, con una densidad capilar reducida y con vasos sanguíneos disfuncionales (Corvera and Gealekman, 2014; Sun et al., 2013b; Trayhurn, 2013; Voros et al., 2005), lo que hace que determinadas zonas del WAT vean limitado su aporte de oxígeno (Figura 1). Esta situación se ve agravada por el hecho de que el diámetro que alcanzan los adipocitos durante el desarrollo de la obesidad supera la distancia de difusión del oxígeno (Lolmede et al., 2003). Como consecuencia, tiene lugar la aparición de focos hipóxicos en el WAT de individuos obesos, tanto en ratones como en humanos (Hosogai et al., 2007; Lee et al., 2011; Pasarica et al., 2009; Ye et al., 2007). Además, recientemente, *Lee y colaboradores* demostraron que los adipocitos de ratones obesos, mantenidos con HFD, consumen inicialmente más oxígeno que los adipocitos de ratones delgados mantenidos con dieta normal (Lee et al., 2014b), agravando aun más la situación de falta de oxígeno. Finalmente, y como consecuencia de la exposición crónica a condiciones de hipoxia, se induce un programa de fibrosis dando lugar a resistencia a insulina, inflamación y disfunción general del WAT (Halberg et al., 2009; Pasarica et al., 2009).

Otro de los fenómenos asociados a la remodelación del WAT en obesidad es la **muerte de adipocitos** (Cinti et al., 2005; Sun et al., 2011) (Figura 1). Estudios en ratones han demostrado que, en el contexto de la obesidad, la tasa de muerte de adipocitos incrementa enormemente. Concretamente, el 80% de los adipocitos del tejido adiposo epididimal mueren tras unos pocos meses de administración de HFD (Strissel et al., 2007). Además, la necrosis de los adipocitos va asociada a un incremento en la **infiltración de macrófagos** (Figura 1), los cuales se localizan alrededor del adipocito necrótico para captar los ácidos grasos que se liberan, formando una gran célula multinucleada o sincitio, también llamada “estructura en forma de corona” (*Crown-like structure*, CLR) que es considerada una de las marcas de inflamación crónica del WAT (Cinti et al., 2005; Lumeng et al., 2007; Nishimura et al., 2007; Nishimura et al., 2008; Strissel et al., 2007). Por último, otra de las características asociadas a la obesidad es la **disfunción mitocondrial** (Kusminski and Scherer, 2012), que conlleva alteraciones en el metabolismo del adipocito blanco y secreción de adipocinas (ver más adelante).

En conjunto, todas estas alteraciones dan lugar a un tejido adiposo inflamado y disfuncional, con una secreción alterada de adipocinas que tendrá consecuencias en el resto de tejidos y dará lugar, entre otros, a resistencia a insulina y, si la situación se mantiene de forma crónica, a la aparición de diabetes tipo II (Rosen and Spiegelman, 2014) (Figura 1).

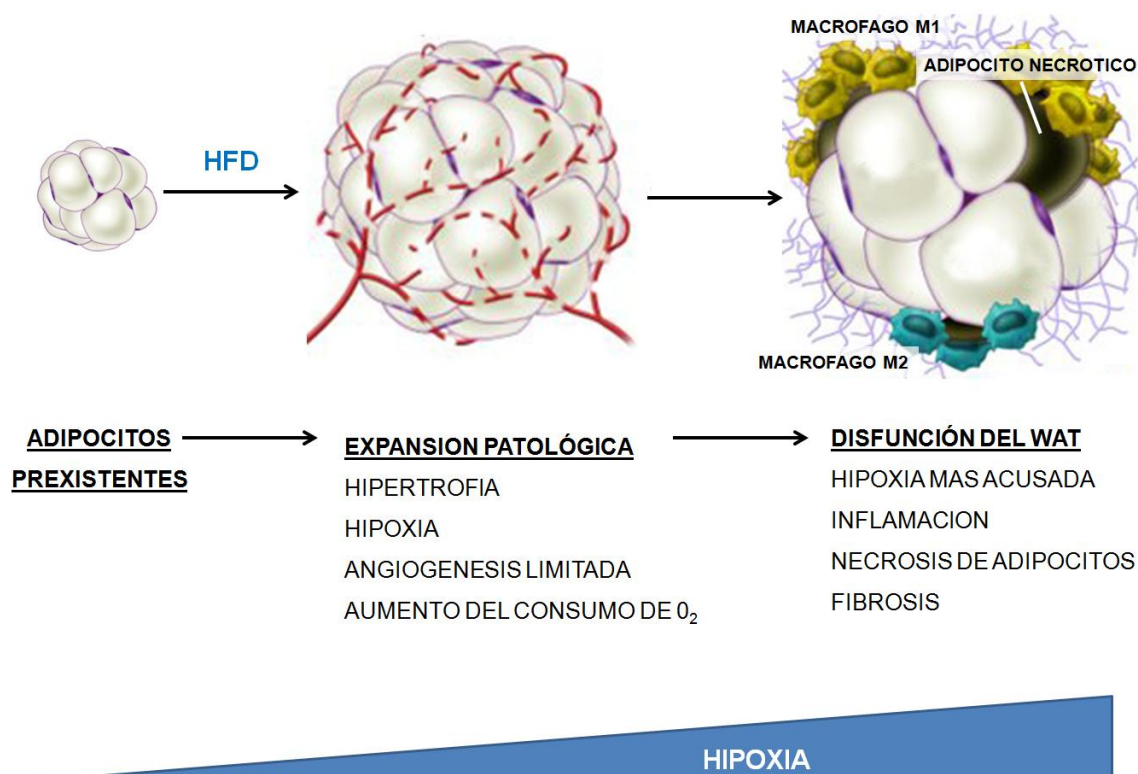


Figura 1. Remodelación del WAT inducida por dieta.

La administración de HFD promueve la expansión patológica del WAT dando lugar a la aparición de focos hipóxicos y la formación de vasos sanguíneos disfuncionales. Por una parte, el incremento en la cantidad de FFA tras la HFD aumenta el consumo de oxígeno de los adipocitos (desacoplado de la producción de ATP) y por otra, los adipocitos aumentan su tamaño (hipertrofia) masivamente; ambos eventos se han relacionado directamente con la aparición de focos hipóxicos. Además, esta expansión patológica también lleva asociada la formación de vasos sanguíneos disfuncionales, lo que limita aun más el aporte de oxígeno haciendo que la situación se agrave. Como consecuencia de esta hipoxia crónica se inducirá un programa de fibrosis y, finalmente, se reclutarán macrófagos al interior del WAT promoviendo un estado inflamatorio y dando lugar a un WAT disfuncional.

Adaptado de Sun et al 2011

1.3. MITOCONDRIA

1.3.1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE LA MITOCONDRIA

Las mitocondrias son orgánulos celulares de doble membrana presentes prácticamente en todas las células eucariotas, cuya función principal es proveer de energía a la célula (ATP y calor) y de los metabolitos necesarios para las rutas anabólicas generados en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA). Las mitocondrias son orgánulos muy dinámicos, de modo que el número y organización de las mismas dentro de la célula depende del tipo celular y de su demanda energética (Cavalier-Smith, 1987). Por ejemplo, se sabe

que el número y la actividad mitocondrial se ven incrementados en el músculo durante ejercicios de resistencia (Hoppeler and Fluck, 2003).

Como se ha indicado anteriormente, las mitocondrias poseen dos membranas: la membrana mitocondrial externa, que la separa del citoplasma, y la membrana mitocondrial interna, que delimita la matriz mitocondrial; entre ambas queda comprendido el espacio intermembrana. La membrana mitocondrial interna es especialmente relevante para la función mitocondrial, ya que además de ser una barrera muy selectiva al paso de iones y otras sustancias, se pliega en forma de crestas proporcionando una gran superficie para el anclaje de la cadena de transporte electrónico (ETC) (ver más adelante). Otra de las características importantes de la mitocondria es que posee su propio genoma, denominado ADN mitocondrial (mitADN) (Clayton, 1982), el cual es indispensable para la función mitocondrial ya que codifica para 13 proteínas de los complejos de la ETC además de para varios ARN transferentes y ribosómicos mitocondriales. La mayoría de las proteínas mitocondriales, sin embargo, son codificadas por el ADN nuclear.

En relación con la función de la mitocondria, además de proveer a la célula de la energía que necesita mediante la fosforilación oxidativa (OXPHOS, ver más adelante), en la matriz mitocondrial tienen lugar numerosas rutas metabólicas como la beta-oxidación de ácidos grasos, biosíntesis de metabolitos intermediarios para la síntesis de aminoácidos y pirimidinas, etc. (Figura 2). Debido a su implicación en múltiples rutas metabólicas, la mitocondria es el origen y la diana de numerosas señales que modulan la homeostasis energética de todo el organismo. Como consecuencia, la disfunción mitocondrial está íntimamente asociada a numerosas patologías muy comunes como enfermedades neurodegenerativas, cardiomiopatías, síndrome metabólico y obesidad (Nunnari and Suomalainen, 2012; Ylikallio and Suomalainen, 2012). De hecho, los primeros tejidos afectados por una actividad mitocondrial subóptima son aquellos más dependientes de la mitocondria, como por ejemplo el músculo esquelético, el músculo cardíaco, el hígado y el WAT (Kusminski and Scherer, 2012). Concretamente, en los últimos años numerosos estudios han establecido una relación directa entre la obesidad y la disfunción mitocondrial (Kusminski et al., 2012; Kusminski and Scherer, 2012), quedando patente la relevancia del buen funcionamiento mitocondrial en los adipocitos para mantener una buena homeostasis energética.

1.3.2. PAPEL DE LA MITOCONDRIA EN EL TEJIDO ADIPOSO BLANCO

El WAT no ha sido considerado tradicionalmente como un tejido oxidativo ya que, como se ha indicado anteriormente (ver sección anterior), los adipocitos blancos almacenan TAGs que, en principio, serán oxidados en su mayoría en otros tejidos más oxidativos como corazón o músculo esquelético para satisfacer sus necesidades energéticas. Por otro lado, debido a la estructura tan especializada que presentan los adipocitos, la mayor parte de su volumen está ocupado por la gota lipídica y la densidad mitocondrial dentro del tejido es baja. Esta visión general de una contribución limitada de la actividad mitocondrial en la función del WAT (en comparación con otros tejidos) ha sido reevaluada en numerosos estudios en los últimos años (Kusminski et al., 2012; Kusminski and Scherer, 2012; Vernochet et al., 2014; Vernochet et al., 2012). Se ha considerado que, aunque la densidad mitocondrial en el WAT es baja, la actividad mitocondrial del mismo en conjunto puede ser relevante en el metabolismo global del organismo puesto que el tejido adiposo (en peso) en humanos puede representar entre el 10-40% del peso total del individuo.

Por otro lado, la mitocondria juega un papel esencial en la biología del adipocito y el desarrollo de la obesidad. En primer lugar, los adipocitos coordinan las señales nutricionales y hormonales que reciben (insulina, catecolaminas, ácidos grasos circulantes, etc.) modulando la actividad mitocondrial, ya sea favoreciendo la oxidación (incrementando la OXPHOS), por ejemplo en respuesta a catecolaminas, o favoreciendo el almacenamiento de ácidos grasos y carbohidratos en forma de TAGs (lipogénesis y/o reesterificación de ácidos grasos) hasta que éstos sean de nuevo requeridos para su consumo, como ocurre en respuesta a un incremento en los niveles de insulina (Kusminski and Scherer, 2012) (Figura 2). En segundo lugar, numerosos estudios han demostrado que la biogénesis mitocondrial está directamente asociada a la diferenciación y maduración de los adipocitos, aportando el ATP y los metabolitos necesarios durante el proceso (Shi et al., 2008; Villarroya et al., 2009; Wilson-Fritch et al., 2003; Wilson-Fritch et al., 2004). En este sentido, en la matriz mitocondrial se generan numerosos intermediarios metabólicos (Acetil-CoA, Gliceraldehído-3-fosfato, etc.) necesarios para la síntesis y esterificación de ácidos grasos que tienen lugar durante la adipogénesis, así como en la expansión del WAT (Figura 2). Un estudio reciente ha demostrado una asociación directa entre un incremento en la actividad del complejo III mitocondrial (concretamente mayor biogénesis mitocondrial y aumento de la producción de ROS) y la adipogénesis (Kusminski and Scherer, 2012; Tormos et al., 2011). Por último, es importante destacar la relevancia de una buena actividad

mitocondrial para la función endocrina de los adipocitos blancos (Figura 2). Cuando las mitocondrias no funcionan correctamente, como ocurre en estadios avanzados de obesidad, la secreción de numerosas adipoquinas se ve alterada, como por ejemplo la adiponectina. En este sentido, *Koh y colaboradores* describieron que la estimulación de la biogénesis mitocondrial en adipocitos mediante la sobreexpresión del factor de transcripción mitocondrial NRF1 aumenta la secreción de adiponectina (Koh et al., 2007). Mientras que los tratamientos que disminuyen la función o la biogénesis mitocondrial, como el silenciamiento del factor de transcripción mitocondrial (TFAM) o de la oxido nítrico sintasa endotelial (eNOS), reducen la expresión de adiponectina (Koh et al., 2010; Koh et al., 2007).

En conclusión, los efectos biológicos de la disfunción mitocondrial en adipocitos no se circunscriben al propio adipocito blanco sino que tiene un impacto sistémico por el carácter endocrino del WAT (ver más arriba) (Koh et al., 2007; Kusminski and Scherer, 2012).

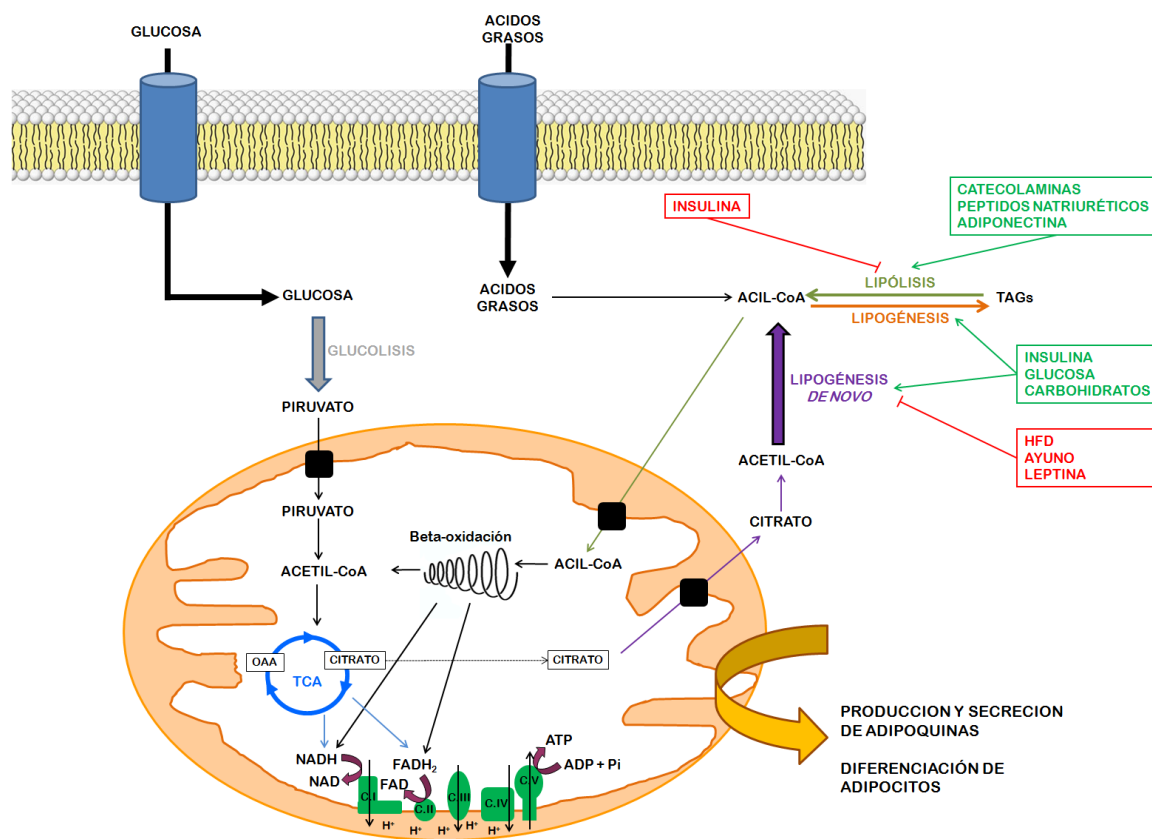


Figura 2. La mitocondria y sus funciones en el adipocito blanco.

La glucosa y los ácidos grasos son captados por la célula y oxidados hasta acetil-CoA por la ruta glucolítica o la beta-oxidación de ácidos grasos respectivamente. El acetil-CoA proveniente de glucosa o ácidos grasos será incorporado al TCA donde se generarán equivalentes de reducción (NADH y FADH₂) que serán oxidados en los complejos I y II de la ETC. Los electrones serán transferidos desde los equivalentes de reducción hasta el oxígeno molecular a través de la ETC acoplado al bombeo de protones hacia el espacio intermembrana, dando lugar a un gradiente electroquímico. Este gradiente será empleado como fuerza motriz por la ATP sintasa (complejo V) para producir ATP. Parte del citrato generado en el TCA puede ser exportado al citoplasma y empleado para la generación de lípidos mediante la ruta lipogénica (lipogénesis *de novo*) que, posteriormente, serán esterificados hasta TAGs e incorporados a la gota lipídica. Todas estas rutas metabólicas están reguladas por múltiples factores, tanto hormonales (insulina, leptina, adiponectina, etc.), como nutricionales (glucosa, ácidos grasos, ayuno, etc.). Además la mitocondria en los adipocitos está implicada en la síntesis y secreción de factores solubles (como adiponectina), así como en la adipogénesis (diferenciación de adipocitos).

1.3.3. DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL Y OBESIDAD

En relación con la disfunción mitocondrial y su asociación con la obesidad es importante señalar de nuevo que, aunque la densidad mitocondrial de los adipocitos es baja, el WAT puede llegar a representar alrededor del 40% de la masa corporal en adultos obesos, de modo que cualquier alteración del metabolismo mitocondrial en el WAT puede influir enormemente en la homeostasis energética del todo el cuerpo (Kusminski and Scherer, 2012). En este sentido, mediante el uso de modelos animales de obesidad (HFD, ratones deficientes en la señalización de la leptina *ob/ob* y *db/db*), se ha

demostrado que hay una disminución del contenido mitocondrial en los ratones obesos comparados con sus respectivos controles (Choo et al., 2006; Rong et al., 2007). En el caso de los humanos, estudios en pacientes obesos y diabéticos han revelado que ambas patologías correlacionan con la aparición de signos de disfunción mitocondrial en el WAT (Dahlman et al., 2006; Kaaman et al., 2007). Con respecto a la contribución relativa de la mitocondria del adipocito blanco en la disfunción metabólica asociada a la obesidad, otro ejemplo claro son las tiazolidinedionas (TDZs). Estos fármacos fueron uno de los primeros tratamientos para la diabetes debido a su capacidad para mejorar la sensibilidad a insulina en el WAT y en el músculo. Estudios realizados *in vivo* e *in vitro*, han demostrado que las TDZs estimulan y mejoran la biogénesis, la función y la morfología mitocondrial, así como la oxidación de ácidos grasos y la secreción de adiponectina en los adipocitos blancos (Bogacka et al., 2005; Choo et al., 2006; Nawrocki et al., 2006; Wilson-Fritch et al., 2003; Wilson-Fritch et al., 2004). En conjunto estos datos indican que la estimulación de la biogénesis y función mitocondrial en el adipocito blanco mediante el uso de TDZs tiene potencia suficiente para aliviar las patologías asociadas a la obesidad (resistencia a insulina, hiperinsulinemia, disminución de la secreción de adiponectina).

En conclusión, la disfunción mitocondrial en los adipocitos está altamente ligada al desarrollo de otras patologías asociadas a la obesidad tales como la diabetes tipo 2. Entender qué cambios moleculares tienen lugar durante la ganancia de peso puede ser un factor clave que permita controlar y/o revertir la expansión del WAT.

1.3.4. SISTEMA DE FOSFORILACIÓN OXIDATIVA (OXPHOS)

La cadena de transporte electrónico (ETC) (complejos I-IV) y la síntesis de ATP (complejo V) son llamados en conjunto: sistema de fosforilación oxidativa (Sistema OXPHOS u OXPHOS). Los complejos I-IV son responsables de la oxidación de los equivalentes de reducción, en forma de NADH o FADH₂, generados en diferentes rutas metabólicas (glucólisis, beta-oxidación de ácidos grasos y/o TCA) (Figura 2). La oxidación del NADH o FADH₂ está acoplada al bombeo de protones hacia el espacio intermembrana, generando un gradiente electroquímico que será aprovechado por la ATP sintasa (complejo V) para sintetizar ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico (Pi) (Figura 2). Los electrones procedentes del NADH entran en la ETC a través del complejo I, mientras que el FADH₂ dona los electrones al complejo II. Estos electrones son transferidos a la coenzima Q (coQ) y posteriormente al complejo III, citocromo c y complejo IV, quien finalmente se los transferirá al oxígeno molecular dando como

resultado agua. El bombeo de protones hacia el espacio intermembrana únicamente se produce en los complejos I, III y IV (Figura 2).

Más del 90% del oxígeno que respiramos es consumido en la mitocondria por el sistema OXPHOS, concretamente por el complejo IV de la ETC, que es el encargado de transferir los electrones al oxígeno molecular, el aceptor final de electrones (Rolfe and Brown, 1997; Taylor, 2008). Este hecho pone de manifiesto la elevada dependencia de la respiración mitocondrial del oxígeno; como consecuencia de ello, pequeñas fluctuaciones en la disponibilidad de oxígeno dan lugar a respuestas adaptativas en la célula que afectan directamente al metabolismo mitocondrial y son esenciales para la supervivencia de la célula (ver más adelante) (Taylor, 2008).

Como se ha indicado anteriormente, las mitocondrias son orgánulos muy dinámicos, capaces de responder a condiciones de estrés y a las fluctuaciones de nutrientes y oxígeno que tienen lugar habitualmente en la célula mediante la reorganización de los diferentes componentes de la ETC en la membrana mitocondrial interna (Acin-Perez and Enriquez, 2014). Recientemente, *Lapiente-Brun y colaboradores* demostraron la existencia de un nuevo sistema de regulación de estas adaptaciones mediante una organización dinámica de los complejos respiratorios en la membrana mitocondrial interna en forma de super-complejos (SC) (Lapiente-Brun et al., 2013). Según este “modelo dinámico”, todos los complejos de la ETC, excepto el complejo II, pueden asociarse formando SC de manera que, en la mitocondria, podemos encontrar los siguientes super-complejos: C I + C III + C IV (también conocido como respirasoma), C I + CIII ó C III + C IV. Concretamente, describen que el complejo I (C I) normalmente está formando SC; por su parte el complejo III también se encuentra mayoritariamente en SC aunque también puede estar aislado y, por último, el complejo IV (C IV) está mayoritariamente aislado aunque también puede formar SC. La formación de SC es dinámica y responde a las demandas energéticas de la célula; según los sustratos energéticos de los que disponga, la ETC se organizará de tal manera que el transporte de electrones a través de la cadena sea lo más eficiente posible (Acin-Perez and Enriquez, 2014; Lapiente-Brun et al., 2013).

1.4. EL OXÍGENO Y LA RESPUESTA A HIPOXIA

La distribución del oxígeno no es homogénea a lo largo del cuerpo de modo que, en función de la localización anatómica y las condiciones fisiológicas, las células pueden recibir una presión de oxígeno diferente. Se ha descrito que la presión de oxígeno (pO_2) en la mayoría de los tejidos oscila entre los 20-45 mmHg (Braun et al., 2001; Erecinska and Silver, 2001; Ward, 2008), sin embargo existen ciertas localizaciones anatómicas, como la médula ósea o la médula renal, donde la pO_2 es mucho menor, oscilando entre 10-25 mmHg (Chow et al., 2001; Leichtweiss et al., 1969; Singer and Muhlfeld, 2007). En el interior de tumores sólidos, en procesos inflamatorios y durante la expansión del WAT (ver apartado anterior “Remodelación del tejido adiposo blanco”) el aporte de oxígeno también se ve limitado, dando lugar a la aparición de focos hipóxicos locales e incluso a situaciones de anoxia (en el caso de los tumores) (Helmlinger et al., 1997; Trayhurn et al., 2008; Ward, 2008; Ye et al., 2007).

Por último, es importante señalar que el aporte de O_2 en los organismos pluricelulares no es constante, sino que está sujeto a fluctuaciones (variaciones en el flujo sanguíneo, pérdida de sangre, cambios en el consumo de oxígeno, etc.), de modo que las células han de estar provista de sensores de oxígeno que les permitan detectar estas fluctuaciones y adaptar su metabolismo a las mismas. Todo este proceso se conoce como “mecanismos de respuesta a hipoxia” y en él están involucrados los factores inducibles por hipoxia (HIF) que son los responsables de desencadenar la respuesta transcripcional adaptativa a las fluctuaciones de oxígeno.

1.4.1. LA RESPUESTA A HIPOXIA

Como se ha indicado anteriormente, los factores de transcripción HIF son mediadores fundamentales de la respuesta adaptativa a la hipoxia, sin embargo no son ellos quienes detectan los niveles de O_2 disponibles. La familia de proteínas dioxigenasas dependientes de 2-oxoglutarato (PDH1, PHD2 y PHD3) son los sensores de O_2 de las células que detectan de manera primaria las fluctuaciones en el aporte de O_2 . En condiciones de normoxia, las PHDs tienen suficiente O_2 para mediar la hidroxilación de las subunidades HIFalfa en dos residuos de prolina críticos, los cuales serán reconocidos por la proteína Von Hippel Lindau (VHL), que forma parte del complejo E3 ubiquitín ligasa, que ubiquitina las subunidades HIFalfa desencadenando su degradación vía proteasoma (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001). Por tanto, en condiciones de normoxia los factores HIFs no son activos porque las subunidades HIFalfa son degradadas de forma constitutiva (Figura 3 parte izquierda). En hipoxia, sin

embargo, las PHDs no disponen del O_2 necesario para llevar a cabo la hidroxilación de las subunidades HIFalfa, de modo que estas no podrán ser reconocidas por VHL ni degradadas en el proteasoma, y su expresión aumenta por estabilización de las subunidades HIFalfa. Cuando estas subunidades HIFalfa se estabilizan, son traslocadas al núcleo donde heterodimerizan con las subunidades HIFbeta (que se expresan de forma constitutiva) y promueven la transcripción de genes diana (Semenza, 2003b) (Figura 3 parte derecha).

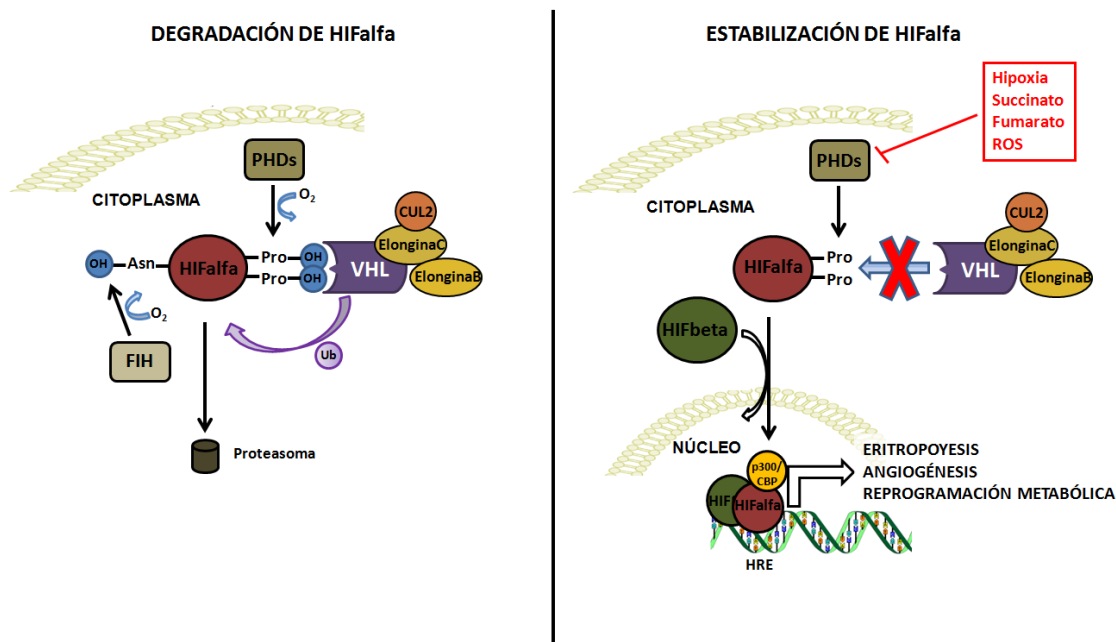


Figura 3. Mecanismo de estabilización y activación de HIFalfa.

En presencia de O_2 (parte izquierda de la figura), las enzimas PHDs hidroxilan en la subunidad HIFalfa los residuos de prolina (Pro), haciendo que el complejo VHL-ubiquitin ligasa lo reconozca y ubiquitine para su degradación por la vía del proteasoma. Además, el factor inhibidor de HIF (FIH) hidroxila un residuo de asparagina (Asn) impidiendo la unión de los coactivadores p300/CBP. Cuando el aporte de oxígeno se ve limitado (representado en la parte derecha de la figura), la actividad de las PHDs y de FIH se ve comprometida. La inhibición de las PHDs permite la estabilización de HIFalfa ya que al no estar hidroxilado no podrá ser reconocido por VHL; como consecuencia se formarán heterodímeros de las subunidades HIFalfa y beta que se traslocarán al núcleo, donde activarán la transcripción de genes diana por unión a las secuencias HRE. En normoxia la actividad de las PHDs también puede ser inhibida en determinados contextos por algunos metabolitos intracelulares, incluyendo el succinato, el fumarato y las especies reactivas de oxígeno ROS.

La familia de los factores de transcripción HIF está compuesta por 3 subunidades alfa (HIF1A, HIF2A y HIF3A) y dos subunidades beta (HIF1B y HIF2B). Tanto las subunidades alfa como las beta presentan un dominio *basic helix-loop-helix* (bHLH) necesario para la unión al ADN y un dominio PAS implicado en la heterodimerización entre las isoformas alfa y beta (Jiang et al., 1996; Wang et al., 1995). Además, las subunidades alfa poseen dos dominios de transactivación, uno en posición N-terminal

(N-TAD) y otro en posición C-terminal (C-TAD), mientras que la subunidad beta solo presenta un dominio de transactivación (TAD). Respecto a las subunidades alfa, las dos más estudiadas son las isoformas HIF1A y HIF2A. Ambas presentan un 48% de homología y comparten similitudes estructurales y bioquímicas, sin embargo presentan patrones de expresión y funciones diferentes (Calzada and del Peso, 2007).

1.4.2. RESPUESTA TRANSCRIPCIONAL INDUCIDA POR HIFalfa.

La respuesta a hipoxia implica la activación de la transcripción de numerosos genes y tiene dos objetivos principales; por una parte, aumentar el suministro de O₂ a las células afectadas (activación de eritropoyesis, angiogénesis, etc.) y por otra, hacer que las células se adapten a la falta de O₂ mediante la inducción de una reprogramación metabólica esencial para la supervivencia de las células (Calzada and del Peso, 2007).

Con el objetivo de **mejorar el suministro de O₂** a las zonas afectadas, los factores HIFs, por una parte, promueven la producción de eritropoyetina (EPO) en el riñón que incrementa el número de glóbulos rojos circulantes en sangre posibilitando un mayor transporte del O₂ y, por otro lado, para restablecer el flujo sanguíneo en los focos hipóxicos, promueve la generación de nuevos vasos induciendo la expresión de VEGF-A (Bergers and Benjamin, 2003; Semenza, 2003a).

En relación con la **reprogramación metabólica** inducida por los factores HIFs, las células en situación de hipoxia experimentan un cambio en su metabolismo, que pasa de ser aerobio a anaerobio (Aragones et al., 2009). Para ello, HIF1A, por una parte, estimula el flujo glucolítico mediante la inducción de numerosos genes relacionados con esta ruta, entre los que se encuentran los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT3, las hexoquinas HK1 y HK2 y la enzima lactato deshidrogenasa LDH-A (Firth et al., 1994; Majmundar et al., 2010). Por otra parte, para evitar la acidificación celular como consecuencia del elevado flujo glucolítico, HIF1A también aumenta la expresión de transportadores que promueven la salida de lactato y protones, como el transportador monocarboxílico 4 (MCT4) y el intercambiador de iones Na⁺ /H⁺ -1 (NHE-1) (Shimoda et al., 2006; Ullah et al., 2006). Otro aspecto clave de la reprogramación metabólica inducida en respuesta a hipoxia es la disminución del metabolismo mitocondrial. HIF1A enlentece el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) mediante la inactivación del complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) encargado de la conversión de piruvato a acetil-CoA. HIF1A induce la expresión de varias isoformas de la enzima piruvato deshidrogenasa quinasa (PDK1, 3 y 4) quienes inactivan el complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) (Aragones et al., 2008; Kim et al., 2006; Papandreou et al.,

2006). Además, HIF1A disminuye el transporte de electrones a través de la ETC afectando a la expresión de algunos de sus componentes. En este sentido, mediante la inducción de la expresión de NDUFA4L2, inhibe la actividad del complejo I mitocondrial (Tello et al., 2011); además, disminuye la expresión de la subunidad mitocondrial SDH-B, un componente del complejo II (Dahia et al., 2005). Finalmente, aumenta la eficiencia en el transporte de electrones a través del complejo IV induciendo un cambio en los componentes de este complejo, de modo que promueve la degradación de la subunidad COX4i, a la vez que induce la expresión de COX4ii (Fukuda et al., 2007). Por último, HIF1A también inhibe la biogénesis mitocondrial reprimiendo c-MYC (Zhang et al., 2007).

Con todos estos cambios, la respuesta adaptativa a la hipoxia consigue reducir el consumo de oxígeno hasta un 15% de la respiración basal (Sridharan et al., 2008), lo cual es esencial para la supervivencia de estas células en condiciones de hipoxia.

1.4.3. PAPEL DE HIF EN LA EXPANSIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO BLANCO

Como se ha indicado anteriormente, uno de los eventos primarios durante la expansión del WAT es la aparición de focos hipóxicos (Hosogai et al., 2007; Lee et al., 2011; Lee et al., 2014b; Pasarica et al., 2009; Ye et al., 2007) y, como consecuencia, la estabilización de HIF1A (Krishnan et al., 2012; Lee et al., 2014b; Ye et al., 2007; Yin et al., 2014). En este sentido, varios estudios en ratones *ob/ob*, así como en ratones mantenidos en HFD, demuestran que, en paralelo con la estabilización de HIF1A en el WAT de ratones obesos tiene lugar la inducción de algunas de sus dianas, como por ejemplo GLUT1 y PDK1 (Halberg et al., 2009; Rausch et al., 2008; Wood et al., 2007). Por otra parte, estudios con ratones deficientes para HIF1A específicamente en adipocitos, demuestran que juega un papel central en el desarrollo de la obesidad inducida por dieta ya que los ratones carentes en HIF1A son resistentes a la obesidad inducida por HFD. Los mecanismos de acción de HIF1A en el WAT relacionados con la ganancia de peso descritos hasta ahora (basados en los modelos animales deficientes en HIF1A) son diversos:

(i) **Regulación de la lipogénesis *de novo*.** Los ratones deficientes en *Hif1beta* (y por tanto también en la respuesta a hipoxia mediada por HIF1A) presentan menores niveles de expresión en sus adipocitos de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT4, y de los genes implicados en la ruta lipogénica. De esta manera, consiguen disminuir la lipogénesis *de novo*, tanto por represión directa de los genes implicados en la ruta, como de manera indirecta disminuyendo la captación de glucosa (Lee et al., 2011).

(ii) **Sensibilidad a insulina y tolerancia a glucosa.** La delección de *Hif1a* en adipocitos promueve una mejora en la sensibilidad a insulina, ya que promueve la secreción de adiponectina por parte de los adipocitos a través de la ruta SOCS3 - JAK2/STAT3 (Jiang et al., 2011), y mejora la tolerancia a glucosa por la inducción de la secreción de insulina por la ruta adiponectina-GLP1 en las células intestinales (Kihira et al., 2014).

(iii) **Regulación del catabolismo lipídico.** HIF1A afecta al catabolismo lipídico en varios puntos. De forma directa es, capaz de reprimir la expresión de SIRT2 por unión a su promotor, lo que impedirá la deacetilación de PGC1A, que no podrá inducir la expresión de genes diana implicados en beta-oxidación y biogénesis mitocondrial (Krishnan et al., 2012) y, de forma indirecta, mediante la represión de la secreción de adiponectina (Jiang et al., 2011).

(iv) **Inflamación y fibrosis.** La delección o inactivación de *Hif1a* en adipocitos previene la infiltración de macrófagos y por tanto la inflamación del WAT asociada a la obesidad (Kihira et al., 2014; Sun et al., 2013a), mientras que su sobreexpresión produce el efecto contrario dando lugar a un aumento de la fibrosis en el WAT. La sobreexpresión de HIF1A en el WAT induce la enzima lisil oxidasa, LOX, que promueve el entrecruzamiento de las fibras de colágeno y, por tanto, aumenta la fibrosis del WAT (Halberg et al., 2009).

En definitiva, numerosos estudios han demostrado que HIF1A juega un papel esencial en el desarrollo de la obesidad inducida por dieta debido a que se estabiliza en las primeras fases de la expansión del WAT. Además, su estabilización mantenida es crucial en el agravamiento de este proceso y el desarrollo de las patologías asociadas. La mayoría de estos estudios se han llevado a cabo utilizando como modelos de obesidad ratones *ob/ob* o ratones mantenidos con HFD, sin embargo no se sabe qué ocurre durante la expansión del WAT asociada a la edad (que implica una ganancia de peso más paulatina) ni el papel que tiene HIF1A en este proceso.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis es caracterizar los cambios metabólicos que tienen lugar en los adipocitos blancos durante las primeras fases del desarrollo de la obesidad utilizando para ello un modelo de ganancia de peso asociada a la edad, así como el papel del factor de transcripción HIF1A en todo este proceso.

Con esta finalidad se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterización de los cambios moleculares que tienen lugar durante la expansión del WAT asociada a la edad, prestando especial atención a la mitocondria y los componentes de la ETC.
2. Evaluación del potencial de los componentes mitocondriales regulados durante el envejecimiento para modular el tamaño del adipocito blanco con la edad.
3. Estudio del papel de HIF1A en la expansión del WAT asociada a la edad así como su impacto sobre la actividad y función mitocondrial en adipocitos blancos.
4. Caracterización del mecanismo molecular responsable de la regulación de los componentes mitocondriales vulnerables al envejecimiento y estabilización de HIF1A.
5. Estimación del valor clínico de aquellos componentes mitocondriales regulados durante el envejecimiento en el tejido adiposo blanco de humanos.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. LÍNEAS CELULARES.

Se utilizaron las siguiente líneas celulares: preadipocitos inmortalizados 3T3-L1 (ATCC), HEK 293T y fibroblastos embrionarios de ratón inmortalizados (MEF). La línea celular 3T3-L1 se mantuvo en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal de ternera (FCS, ATCC). La línea celular HEK 293T se mantuvo en DMEM suplementado con suero bovino fetal al 10% (FBS, Cultek). Los MEF se mantuvieron en DMEM suplementado con FBS al 10% (BioWest). Todos los medios fueron suplementados con 100 unidades/ml de penicilina y 100 mg/ml de estreptomycin.

Las células se cultivaron de forma rutinaria en 21% de O₂ y 5% CO₂ (condiciones de normoxia). Para la exposición a condiciones de hipoxia, las líneas celulares se cultivaron durante 18-20hr en un incubador INVIVO2 400 (Ruskin Technology) siendo la atmosfera de 0,5% O₂, 94% N₂ y 5% CO₂.

3.2. TRASDUCCIÓN LENTIVIRAL DE LÍNEAS CELULARES.

El silenciamiento y la sobreexpresión estable de COX5B se realizaron mediante transducción lentiviral. Para ello, se transfectaron placas de p100 de células empaquetadoras HEK 293T con 8 µg del vector lentiviral deseado y 5 µg de los plásmidos de empaquetamiento (pmd2.G y pCMV8.9) utilizando Lipofectamine 2000 (Invitrogen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los sobrenadantes del cultivo celular de las células HEK 293T se recogieron 24 horas después de la transfección, se filtraron con un filtro de 0,45 micras y se añadieron a las células diana, en este caso 3T3-L1. Este paso se repitió nuevamente en los siguientes 2 días. Las células infectadas se seleccionaron añadiendo al medio de cultivo puomicina a una concentración final de 1µg/ml.

Para el silenciamiento de COX5B de forma estable se emplearon vectores lentivirales comerciales de la casa comercial Open Biosystems (shSCR, Ref.RHS 4346 y shCOX5B, Ref.V3LMM_515720). A partir de la línea celular 3T3-L1 se generaron en el laboratorio mediante transducción lentiviral las líneas celulares estables: 3T3-L1-shCOX5B que expresa el shRNA contra COX5B previamente mencionado, así como su respectivo control 3T3-L1-shSCR que expresa un shRNA con una secuencia aleatoria.

Para la sobreexpresión de COX5B de manera estable, se empleó un vector lentiviral que fue generado en el laboratorio a partir del vector comercial pLVX-IRES-ZsGreen

(Clontech). La estrategia de clonaje que se siguió fue la siguiente: se amplificó el ADNc de COX5B murino empleando la siguiente pareja de oligonucleótidos: F: 5'-GTCCCGCCCATCTTGCT-3'; R: 5'-GCCAGTGCAATGGCTAATCTTT-3') y se clonó el fragmento de PCR purificado en el vector pCR®2.1-TOPO® TA. Posteriormente se digirió este vector con la endonucelasa EcoRI (New England Biolabs) y el fragmento resultante (ADNc de COX5B) se purificó y fue clonado en el vector pLVX-IRES-ZsGreen para generar el vector pLVX-COX5B-IRES-ZsGreen. En todas las figuras, leyendas de las figuras y en el texto de la tesis, se nombra al vector pLVX-IRES-ZsGreen como vector vacío y al vector pLVX-COX5B-IRES-ZsGreen como COX5B.

3.3. ANÁLISIS DE ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS MEDIANTE TINCIÓN CON ROJO NILO.

Las células 3T3-L1 se plaquearon a un 80% de confluencia en medio DMEM suplementado con suero fetal de ternera (FCS). Después de un día, las células alcanzaron la confluencia y un día más tarde el medio de cultivo fue sustituido por medio DMEM suplementado con FBS o con FBS y azida de sodio 5 mM. El tercer día, las células se despegaron de la placa con tripsina y se centrifugaron durante 5 min a 1200 rpm. El sedimento celular se resuspendió y se fijó con paraformaldehído al 2% durante 15 min a 4 °C. Las células se centrifugaron de nuevo, se resuspendieron en PBS con una concentración final de Rojo Nilo 1 µg/ml (Ref: N3013, Sigma-Aldrich).y se incubaron durante 30 min a 4°C en oscuridad. Tras los 30 min de incubación, las células se lavaron dos veces con PBS frío para eliminar los excedentes de Rojo Nilo y posteriormente se analizó la fluorescencia del Rojo Nilo en las células mediante citometría de flujo utilizando un citómetro modelo Cytomics FC 500 MPL (Becton Dickinson). La fluorescencia del Rojo Nilo se midió en el canal de emisión FL2 y se analizaron 10000 eventos por cada muestra.

3.4. ENSAYO DE ACTIVIDAD DEL COMPLEJO IV.

Los homogeneizados de 3T3-L1, HEK 293T o adipocitos aislados se prepararon mediante tres ciclos de congelación/descongelación en PBS seguidos de centrifugación a 500g durante 10 min a 4°C. Los sobrenadantes se centrifugaron de nuevo a 16000g durante 30 minutos a 4°C y los sedimentos se resuspendieron en PBS. La actividad del complejo IV se analizó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 550 nm como se describió previamente (Balsa et al., 2012). La actividad inespecífica se midió

después de añadir azida de sodio (Ref: S2002; Sigma-Aldrich) al tubo de reacción. La actividad del complejo IV se expresó en relación a los μg de proteína total.

3.5. ELECTROFORESIS EN CONDICIONES NATIVAS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (BN-PAGE).

Las células 3T3-L1-SCR o 3T3-L1-shCOX5B se tripsinizaron y posteriormente se lavaron dos veces en PBS frío. El sedimento de células se resuspendió en 200 μl de PBS, se mezcló con 1 volumen de digitonina 8 mg/ml y se incubó la mezcla durante 10 min en hielo. Posteriormente, se añadió 1 ml de PBS y las muestras se centrifugaron 5 min a 10000 rpm a 4°C; el sedimento se lavó de nuevo y se resuspendió en 100 μl de ácido aminocaproico 1,5 M, Bis-Tris / HCl 50 mM, pH 7. En este punto se cuantificó la cantidad de proteína por BCA; posteriormente, las mitocondrias se centrifugaron 2 min a 12000 rpm a 4°C, y el sedimento se resuspendió a una concentración final de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ con ácido aminocaproico 1,5M, Bis-Tris/HCl 50 mM, pH 7. Las mitocondrias se solubilizaron con digitonina 4 g/g de proteína y se incubaron 5 min en hielo; posteriormente, se centrifugaron 30 min a 13.000 rpm a 4°C, se recogió el sobrenadante y se mezcló con tampón de carga (5% Commassie Brilliant Blue G-250 en solución de ácido aminocaproico 1 M). Se cargaron entre 100-150 μg de cada muestra por pocillo en geles de gradiente de poliacrilamida 3-20% BN-PAGE según describió previamente (Schagger, 1995).

3.6. ENSAYOS DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (ChIP).

Los MEFs se cultivaron en placas de 15cm y se mantuvieron en normoxia o se expusieron a condiciones hipoxia (0,5% de oxígeno) durante 18-20 horas. Posteriormente, las células fueron fijadas con 1% (v/v) de formaldehído de durante 15 min a temperatura ambiente y la fijación se detuvo mediante la adición de glicina 125 mM. Las células se lavaron tres veces con PBS frío y se recogieron por raspado en 5 ml de PBS. Tras centrifugar a 4000 rpm durante 5 min a 4°C, las células se resuspendieron en tampón de lisis 1 (50 mM HEPES pH 7,5, NaCl 140 mM, EDTA 1 mM, 10% de glicerol, 0,5% NP-40 y 0,25% de Triton X-100 suplementado con inhibidores de proteasas) y se incubaron en hielo durante 10 min. Tras centrifugar, los sedimentos se resuspendieron en tampón de lisis 2 (10 mM Tris-HCl pH 8,0, NaCl 200 mM, EDTA 1

mM y EGTA 0,5 mM suplementado con inhibidores de proteasas) y se incubaron en agitación durante 10 min a temperatura ambiente. Se separaron los núcleos por centrifugación y los sedimentos de núcleos se resuspendieron en tampón de sonicación ChIP-SDS (NaCl 100 mM, 50 mM Tris-HCl pH 8,1, EDTA 5 mM y SDS 0,5% suplementado con inhibidores de proteasas) y se incubaron de nuevo en agitación durante 20 min a 4°C. Posteriormente, los lisados nucleares se sonicaron bajo las condiciones establecidas para romper el ADN en fragmentos que fueran entre 300 y 1000pb. Seguidamente se retiró el material insoluble por centrifugación y las muestras se diluyeron en tampón de dilución ChIP-Triton (Tris-HCl 100 mM pH 8,6, NaCl 100 mM, EDTA 5 mM y 5% de Triton X-100 suplementado con inhibidores de proteasas). Los lisados fueron preclareados con 100µl de Proteína G sefarosa durante 30 min-2 h a 4°C, se recogieron 100µL de cada muestra y se guardaron (*Input*). El resto se inmunoprecipitó durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo policlonal de conejo anti-c-MYC (Santa Cruz, sc-764-X) o con suero de conejo (IgG control) (Santa Cruz, sc-2027-X). Los inmunocomplejos se recuperaron por adición de 100µl de Proteína G sefarosa a las muestras y posteriormente se lavaron repetidamente dos veces durante 5 min con tampón de dilución ChIP-Triton, tampón de lavado de micela (0,2% de SDS, 1% de Triton X-100, 5% de sacarosa, EDTA 5mM, Tris-HCl 20mM pH 8,1 y NaCl 150mM), tampón 500 (1% Triton X-100, EDTA 1mM, 0,1% de deoxicolato, HEPES 50mM pH 7,5 y NaCl 500mM) y tampón de lavado LiCl/detergente (LiCl 250mM, 0,5% NP-40, 0,5% de deoxicolato, EDTA 1mM y Tris-HCl 10mM pH 8,0). Finalmente, los complejos se lavaron dos veces con tampón TE (Tris-HCl 10mM y EDTA 1mM) y se eluyó con un tampón de elución (1% SDS y NaHCO₃ 100mM). Las uniones ADN-proteína se rompieron tanto en el *Input* como en los inmunoprecipitados mediante la adición de NaCl 200mM e incubando durante toda la noche a 65°C. Las proteínas y el ARN se eliminaron por incubación de las muestras con Proteinasa K (100µg/muestra), EDTA 10mM, Tris-HCl 100mM pH 6,5 y RNasa A (10µg/muestra) durante 1 h a 45°C y el ADN fue purificado usando Fenol: Cloroformo: Isoamílico y, posteriormente, precipitado por incubación durante 1 h a -20°C con acetato de sodio 300mM y 1ml de etanol absoluto. Por último, el ADN se resuspendió en 50µl de agua. El ADN inmunoprecipitado fue amplificado para evaluar la unión de c-MYC al promotor de *Cox5b* y *Cox8a* usando los siguientes oligonucleótidos: Promotor proximal *Cox5b*: F 5'-GTGCGGCGTCTACTTTTAGC-3'; R 5'-TCCGTTGGTGGGAGTCTAAC-3'; Región distal *Cox5b*: F 5'-CCCAAGATTTGCTGGCATCT-3'; R 5'-GAGTGGTGGCATTGTCCTTTAAT-3'. Promotor proximal *Cox8a*: F 5'- CCGAGTGCTGGGATTAAAG -3'; R 5'-TGGAGACCTTAAAAAACCAAACTG -3'.

3.7. MODELOS ANIMALES.

Para la inactivación global de *Hif1a* se emplearon los ratones *Hif1a*^{floxed}-UBC-Cre-ER^{T2}. Estos ratones se generaron cruzando ratones B6.129-*Hif1a*^{tm3Rsjo}/J (The Jackson Laboratory, stock no. 007561) que contienen dos sitios loxP que flanquean el exón 2 del locus murino *Hif1a* (Ryan et al., 2000) con ratones B6.Tg (UBC-Cre/ER^{T2})1Ejb/J (The Jackson Laboratory, stock no.008085), que expresan la recombinasa CRE (Cre-ER^{T2}) de forma ubicua e inducible por tamoxifeno.

Para la inactivación de *Hif1a* específica en adipocitos se emplearon los ratones *Hif1a*^{floxed}-Adiponectina-Cre-ER^{T2}. Estos ratones se generaron cruzando ratones B6.129-*Hif1a*^{tm3Rsjo}/J (The Jackson Laboratory, stock no. 007561) que contienen dos sitios loxP que flanquean el exón 2 del locus murino *Hif1a* (Ryan et al., 2000) con ratones AdipoQ-CreER^{T2} (Sassmann et al., 2010), que expresan la recombinasa CRE (Cre-ER^{T2}) únicamente en adipocitos e inducible por tamoxifeno.

Los ratones fueron criados en el área específica libre de patógenos en el animalario de la Universidad Autónoma de Madrid (UAM). Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético de Investigación de la UAM y se llevaron a cabo bajo la supervisión del responsable del animalario de la UAM de acuerdo con la normativa española y europea (RD 53/2013, BOE, 01 de febrero 2013).

Para la inactivación ubicua de *Hif1a*, ratones *Hif1a*^{floxed}-UBQ-Cre-ER^{T2} de 10-15 semanas de edad, así como sus correspondientes ratones control *Hif1a*^{floxed} fueron alimentados a voluntad durante 25-30 días con una dieta que contiene 400 mg de citrato de tamoxifeno/kg (Teklad CRD TAM⁴⁰⁰/CreER; The Harlan Laboratory). Para la inactivación específica de *Hif1a* en adipocitos, ratones *Hif1a*^{floxed}-Adiponectina-Cre-ER^{T2} y los ratones control *Hif1a*^{floxed} de 25-30 semanas de edad fueron alimentados a voluntad durante 25-30 días con una dieta que contiene 400 mg de citrato de tamoxifeno/kg (Teklad CRD TAM⁴⁰⁰/CreER; The Harlan Laboratory). Después de este período, los animales fueron alimentados de nuevo con una dieta normal de pienso para ratones (Safe®, Augy, Francia). Los ratones macho que no fueron tratados con tamoxifeno para la inactivación génica se utilizaron para los estudios de envejecimiento en el WAT y para las inyecciones lentivirales. En todas las figuras, leyendas de las figuras y en el texto principal, *Hif1a*^{floxed}-Adiponectina-Cre-ER^{T2} (o *Hif1a*^{ΔAdipo}) y *Hif1a*^{floxed}-UBC-Cre-ER^{T2} (o *Hif1a*^{ΔUbq}) se refieren a ratones machos que han sido expuestos a la dieta con tamoxifeno. El control se refiere ratones machos *Hif1a*^{floxed} también tratados con tamoxifeno.

3.8. INYECCIÓN DE PARTÍCULAS LENTIVIRALES *IN VIVO*.

El silenciamiento y la sobreexpresión de COX5B *in vivo* se realizaron mediante transducción lentiviral empleando los mismos vectores lentivirales y método de generación de virus que se usaron en los experimentos *in vitro*. Para llevar a cabo las inyecciones, los ratones fueron anestesiados mediante inhalación de isoflurano (Abbott) antes hacer la incisión en la línea alba abdominal. Únicamente se inyectó el eWAT derecho de los ratones, mientras que el eWAT izquierdo permaneció sin inyectar y se empleó como control interno de cada ratón. Se inyectó un volumen de 100-150µl de preparación lentiviral por ratón que contenía $10^{7/8}$ unidades formadoras de placa por cada 100µl, distribuida en 4-5 inyecciones de 20-25µl cada una. Los ratones inyectados con el lentivirus para silenciar COX5B se sacrificaron 2-3 semanas después de la cirugía y se extrajeron los tejidos de interés, mientras que los ratones inyectados con el lentivirus para sobreexpresar COX5B se sacrificaron 5-6 semanas después de la cirugía. Los ratones fueron asignados al azar a los grupos de tratamiento (grupo shSCR frente a grupo shCOX5B o el grupo vector vacío frente a grupo de sobreexpresión de COX5B).

3.9. ANÁLISIS HISTOLÓGICO.

Se extrajeron los depósitos de tejido adiposo epididimal (eWAT) y se fijaron al menos durante 24h en paraformaldehído 4% antes de la inclusión en parafina. Las secciones (5-7µm; microtomo Leica RM2135x) se tiñeron siguiendo un protocolo estándar de tinción con hematoxilina/eosina y fueron analizados mediante Cell D Olympus Software (Olympus, Alemania). El área de los adipocitos se calculó mediante el uso de software de Adiposoft (Galarraga et al., 2012) y se analizaron al menos 200 adipocitos por ratón.

3.10. AISLAMIENTO DE ADIPOCITOS BLANCOS.

Se extrajeron los depósitos de eWAT, se trocearon con unas tijeras y digirieron usando colagenasa tipo II de *Clostridium histolyticum* (Calbiochem) durante 1 hora a 37°C en tampón KRH suplementado con albúmina de suero bovino (BSA, 3,5 %; Roche). El tejido digerido se filtró usando un filtro de 100µm (BD Falcon) y los adipocitos flotantes se recogieron y se utilizaron para la extracción de ARN o proteína.

3.11. CUANTIFICACIÓN DEL CONTENIDO MITOCONDRIAL EN ADIPOCITOS.

Se extrajo el ADN total de adipocitos aislados del eWAT de ratones jóvenes y envejecidos mediante digestión con Proteinasa K (Ambion) durante toda la noche a 56°C. Tras la digestión, se aisló el ADN de las muestras utilizando UltraPure™ Phenol : Chloroform : Isoamyl (25 : 24 : 1; Invitrogen). El ADN nuclear y mitocondrial se cuantificaron utilizando Power SYBR Green PCR Master Mix kit (Applied Biosystems) y los datos de amplificación se analizaron con StepOne Software versión 2.0 (Applied Biosystems). Para cada muestra se realizaron medidas por duplicado y las parejas de oligonucleótidos usados para las amplificaciones se diseñaron con ayuda del programa Primer Express. Se usaron las siguientes parejas de oligonucleótidos *Hprt* genómico: F 5'-TGGGAGGCCATCACATTGT-3'; R 5'-TCCAGCAGGTCAGCAAAGAA-3'. *mt-Co1* genómico: F 5'-GCTAGCCGCAGGCATTACTATAC-3'; R 5'-GCGGGATCAAAGAAAGTTGTG-3'.

3.12. EXTRACCIÓN DE RNA Y PCR EN TIEMPO REAL.

El ARN total procedente de las líneas celulares 3T3-L1 o HEK 293T así como de adipocitos, hígado, BAT y WAT se obtuvo mediante el uso de Trizol (Invitrogen) con dos ciclos de congelación/descongelación. El ARN total fue aislado utilizando el RNeasy RNA extraction Kit (Qiagen). El ARN extraído se cuantificó usando un Nanodrop (ThermoFisher Scientific). Se usó 1µg de ARN para retrotranscribir a ADNc (Improm-II reverse transcriptase, Promega) y se utilizó 1µl del ADNc resultante como molde para las reacciones de amplificación llevadas a cabo con Power SYBER Green PCR Master Mix kit (Applied Biosystem). Los datos de amplificación se analizaron con StepOne Software versión 2.0 (Applied Biosystems). Para cada muestra se realizaron medidas por duplicado y todos los valores se normalizaron en base a los niveles de expresión del gen *Hprt*. Las parejas de oligonucleótidos usados para las amplificaciones se diseñaron de forma que hibridaran en diferentes exones para evitar amplificaciones de ADN genómico. Dicho diseño se llevó a cabo con ayuda del programa Primer Express. Las parejas de oligonucleótidos empleados se especifican en la Tabla 1.

TARGET	F (5'--3')	R (5'--3')
<i>Hprt</i> ratón	GTAAAGCAGTACAGCCCCAAA	AGGGCATATCCACAACAAACTT
<i>Cox5b</i> ratón	GGAGATCATGATAGCAGCACAGA	AGCTGCCTTTGGAGGTAGCA
<i>Cox6a1</i> ratón	CGAGAGACCCCCGTTTCGT	GTTGTGGAAGAGGGTATGGTTACC
<i>Cox6c</i> ratón	GGAGTTGCCGCTGCCTATAA	AATTCTGCATACGCCTTCTTTCTT
<i>Cox8a</i> ratón	GGGCTCAGGTCCACTCGAA	AAGACAACACACGAAGCAGGAA
<i>Cox5b</i> ratón	GGAGATCATGATAGCAGCACAGA	AGCTGCCTTTGGAGGTAGCA
<i>Cox6b</i> ratón	CCAGACTAAGAACTGTTGGCAGAAC	CCCTTGGCCGTCATTGC
<i>Cox7c</i> ratón	CCGTCGCAGCCACTATGAG	TCCAAAGTACACGGTCATCATAGC
<i>Cox7b</i> ratón	GTTGCCCTTAGCCAAAAACG	CCACTTGCTGAATGCTTCGA
<i>Cox7a2</i> ratón	TCACGAAGGCATTTTGAAAACA	CCCCGCCTTTCAGATGAAC
<i>Cox4i</i> ratón	CCGACTGGAGCAGCCTTTC	TCGTTAAACTGGATGCGGTACA
<i>Ndufa4</i> ratón	CGCTTGGCACTGTTTAATCCA	TCCATGGCTCTGGGTTGTTC
<i>Hif1a</i> ratón	CACCGATTGCGCATGGA	TCGACGTTCAAGAACTCATCTTTT
<i>Hprt</i> humano	ATTGTAATACCAGTCAACAG	GCATTGTTTTGCCAGTGTCAG

Tabla 1. Secuencias de oligonucleótidos empleados para PCR en tiempo real.

3.13. INMUNODETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN BLOT.

Las células, tras lavarse con PBS, se lisaron en Laemmli (2% SDS, 10% glicerol, 10mM DTT, 62mM Tris pH6,8 y 0,004% de azul de bromofenol). Los pulverizados de hígado, tejido adiposo marrón (BAT) y WAT de ratón, así como los adipocitos aislados se homogeneizaron en tampón RIPA suplementado con 1% de Triton, 0,2% de SDS e inhibidor de la proteasas libre de EDTA (Roche). La cantidad de proteína de los extractos se cuantificó mediante BCA (Bicin-Choninic Acid Protein Assay Kit, Pierce). Las proteínas contenidas en estos lisados se resolvieron en geles de poliacrilamida-SDS al 8% o 15% y posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa o PVDF. Las membranas se bloquearon con TBS-T (50mM Tris HCl, pH7,6, 150mM NaCl, 0,1% Tween-20) y 5% de leche en polvo desnatada y se incubaron al menos 16 horas a 4°C en cámara húmeda con los anticuerpos primarios correspondientes. Tras la incubación, las membranas se lavaron con TBS-T para eliminar el exceso de anticuerpo primario y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con los respectivos anticuerpos secundarios. La unión del anticuerpo se detectó mediante quimioluminiscencia potenciada (SuperSignal West Femto Maximum Sentitivity Substrate, Thermo Scientific)

y se visualizó con un analizador de imágenes luminiscentes digital (Imagen Quant LAS4000 Mini; GE). Las cuantificaciones de las imágenes se realizaron utilizando la herramienta de análisis de geles del programa ImageJ (NIH).

Los anticuerpos que se han empleado para realizar este trabajo incluyen anticuerpos policlonales de conejo frente a el VDAC1 (ab15895; AbCam), NDUFA4 (BS3883; Bioworld) y HIF1A (10.006.421; Cayman). También se emplearon anticuerpos monoclonales de ratón frente a COX5B (ab110263, AbCam), NDUFA9 (ab14713; AbCam), UQCRC1 (ab110252; AbCam), SDHA (ab1377040; AbCam), mt-Co1 (ab14705; AbCam) y tubulina alfa (T6199, Sigma). Para la detección de los anticuerpos primarios se utilizó, según correspondiese anticuerpos anti-conejo (1:5000)(31460, Pierce) o anti-ratón (1:5000)(32430, Pierce) todos ellos acoplados a HRP (Horseradish peroxidase).

3.14. MUESTRAS DE TEJIDO ADIPOSO HUMANO.

Se tomaron muestras de tejido adiposo visceral (VAT) de 24 pacientes reclutados en el Servicio de Endocrinología del Hospital de Girona "Dr. Josep Trueta". Los parámetros antropométricos y clínicos de la cohorte eran (los valores representan la media \pm desviación estándar): sexo (masculino / femenino): 7/17; edad (años): $44 \pm 10,3$; BMI (kg/m^2): $31,2 \pm 6,1$; glucosa en ayunas (mg/dL): $91,1 \pm 11,2$; colesterol HDL (mg/dL): $55,6 \pm 14,5$; triglicéridos en ayunas (mg/dL)*: 83 (67-191) (*Mediana; rango intercuartil). De forma independiente, se tomaron muestras tejido adiposo subcutáneo (SAT) de 9 participantes reclutados en el Servicio de Endocrinología del Hospital de Girona "Dr. Josep Trueta". Los parámetros antropométricos y clínicos de la cohorte eran (los valores representan la media \pm desviación estándar): Sexo (masculino / femenino): 1/8; edad (años): $43,8 \pm 8,4$; BMI (kg/m^2): $35,8 \pm 4,1$; glucosa en ayunas (mg/dL): 89,5; colesterol HDL (mg/dL): 50,4; triglicéridos en ayunas (mg/dL)*: 96 (61 hasta 173) (*mediana; rango intercuartil). Todos los sujetos eran de origen caucásico y reportaron que su peso corporal había sido estable durante al menos tres meses antes del estudio. No tenían ninguna enfermedad sistémica a parte de obesidad y estaban libres de cualquier infección en el mes anterior al estudio. Aquellos pacientes con enfermedades hepáticas y disfunción tiroidea fueron excluidos. Todos los sujetos dieron su consentimiento informado por escrito tras haberles explicado el propósito del estudio, y el estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de Girona "Dr. Josep Trueta". Las muestras de VAT se obtuvieron durante los siguientes procedimientos quirúrgicos: colecistectomía, cirugía de la hernia abdominal y gástrica cirugía de by-pass. Las

muestras de tejido adiposo fueron inmediatamente transportadas al laboratorio (5-10 min). La manipulación de tejidos se llevó a cabo en condiciones estrictamente asépticas. Las muestras de tejido adiposo se lavaron en PBS, se cortaron en trozos pequeños (100 mg), e, inmediatamente, se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

Para la purificación de ARN se empleó un RNeasy Lipid Tissue Mini Kit (Qiagen, Izasa SA) y la integridad del ARN se verificó con un Agilent Bioanalyzer (Agilent Technologies). La expresión génica se determinó por RT-PCR un LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics SL). Se emplearon parejas de oligonucleótidos TaqMan ® comerciales pre-validadas. Las sondas empleadas fueron: ciclofilina A (PPIA, Hs99999904_m1, control de carga); citocromo c oxidasa subunidad Vb (COX5B, Hs00976765_g1) y canal dependiente de voltaje 1 (VDAC1, Hs01631624_gH). Todos los valores se normalizaron en base a los niveles de expresión de ciclofilina A.

3.15. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los datos se expresaron como media \pm error estándar de la media (SEM). Los datos experimentales se analizaron estadísticamente utilizando el software GraphPad (versión 5.0). Las diferencias estadísticas entre grupos con varianzas similares fueron analizadas con un test de Student de dos colas. Cuando varianzas de los grupos eran significativamente diferentes, se usó un test de Student de dos colas con corrección de Welch's. Las diferencias entre la varianza de los grupos se analizaron con una prueba F. Las diferencias en la expresión de genes en muestras humanas entre diferentes cuartiles de edad se analizaron mediante un test ANOVA. Las asociaciones lineales entre la expresión de genes y la edad o el BMI se evaluaron empleando un test de rangos Spearman's.

4. RESULTADOS

4.1. CAMBIOS MOLECULARES EN EL WAT ASOCIADOS A LA EDAD

4.1.1. GANANCIA DE PESO ASOCIADA A LA EDAD

Con el objetivo de determinar los cambios moleculares que tienen lugar en el WAT durante la ganancia de peso asociada a la edad, en primer lugar definimos el rango de edades en el que se iba a realizar el estudio. Para ello, en base a estudios previos (Borghjrid and Feinman, 2012; Boucher et al., 2012; Guo et al., 2009; Lee et al., 2014a; Wolf et al., 2014), se pesaron ratones macho de la cepa de C57/BL6j de 3-4 meses y de 8-10 meses de edad. El peso de los ratones macho incrementaba desde los $31,7 \pm 1,2$ g (en ratones de 3-4 meses de edad) hasta los $43,3 \pm 3,7$ g (en ratones de 8-10 meses de edad) (Figura 4A), indicando que la ganancia de peso asociada a la edad tiene lugar de forma progresiva y comienza en etapas tempranas durante la vida del ratón.

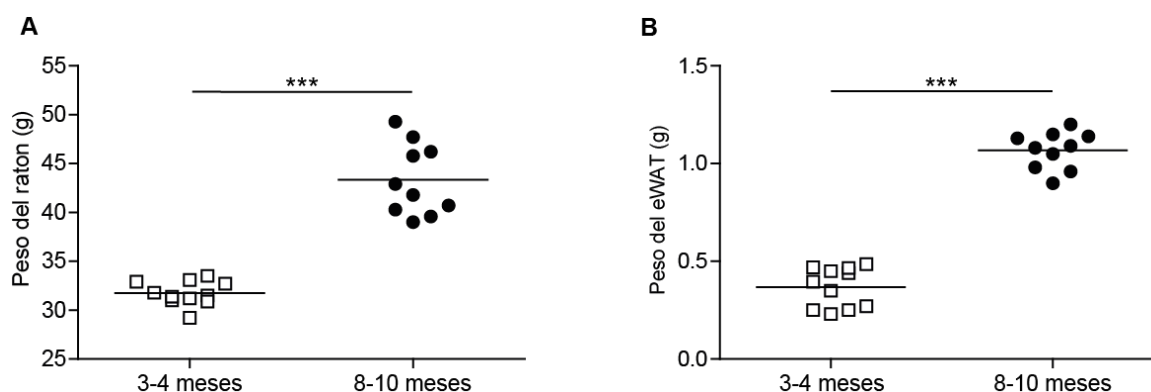


Figura 4. Ganancia de peso asociada a la edad.

(A) Peso de ratones de 3-4 meses (n=11) y 8-10 meses (n=10) mantenidos con dieta normal (B) Peso de eWAT de ratones de 3-4 meses (n=11) y 8-10 meses (n=10) mantenidos con dieta normal. La línea representa la media del conjunto de datos. Para el análisis estadístico se aplicó T-Student (***, $p < 0,001$).

Además, estas diferencias en el peso del animal completo también se tradujeron en un aumento tanto en la masa del tejido adiposo blanco epididimal (eWAT) (Figura 4B), como en el tamaño de los adipocitos del eWAT de ratones de 8-10 meses respecto a ratones de 3-4 meses (Figura 5). La elección del eWAT como modelo de estudio se fundamenta en que, por una parte, es uno de los acúmulos de grasa que más se expande durante el envejecimiento y, por otra, su expansión se ha asociado con el desarrollo de enfermedades metabólicas (Lee et al., 2013). A la vista de los resultados obtenidos, focalizamos nuestro trabajo en la comparativa entre ratones de 3-4 meses, a

los que denominaremos “jóvenes” y ratones de 8-10 meses, a los que llamaremos “envejecidos” que nos permitirán estudiar los desencadenantes moleculares de la expansión del WAT asociada a la edad relacionados con el metabolismo de los adipocitos.

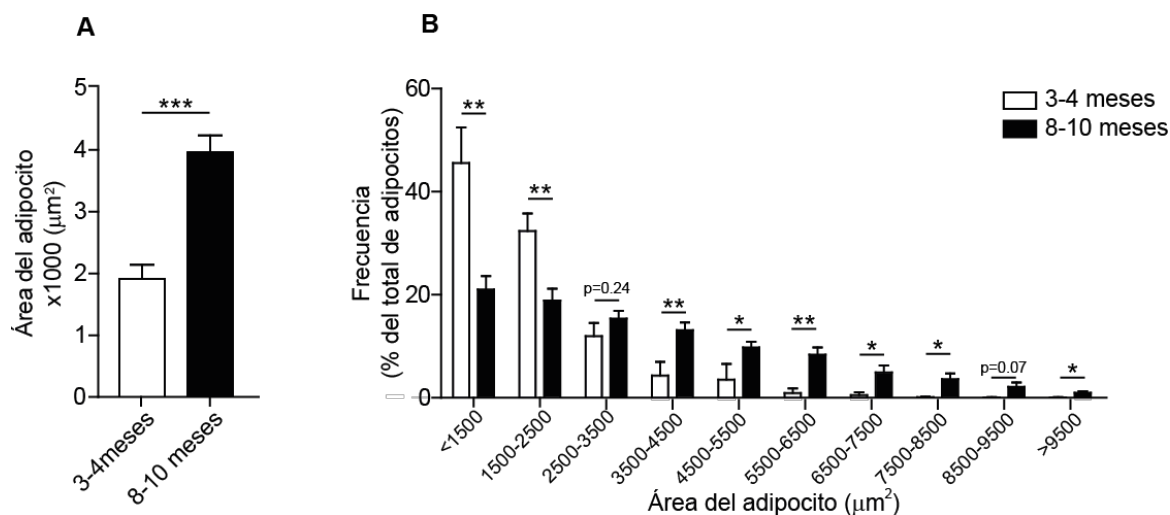


Figura 5. Cambio en el tamaño de los adipocitos durante la ganancia de peso asociada a la edad.

(A) Media del tamaño de adipocitos y (B) distribución de frecuencias de tamaño de los adipocitos en el WAT de ratones de 3-4 meses (n=7) y ratones de 8-10 meses (n=5). Los valores representan la media \pm error estándar. Para el análisis estadístico se aplicó T-Student (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$).

4.1.2. CAMBIOS MOLECULARES ASOCIADOS A LA EXPANSIÓN DEL eWAT

Para ahondar en el estudio de los cambios moleculares que tienen lugar durante el envejecimiento en el eWAT nos centramos, en primera instancia, en la mitocondria puesto que se ha descrito que juega un papel fundamental en la biología del adipocito blanco (Bournat and Brown, 2010; Kusminski et al., 2012; Rosen and Spiegelman, 2014; Villarroja et al., 2009) así como durante el envejecimiento (Lopez-Otin et al., 2013). En primer lugar se comparó el contenido mitocondrial de adipocitos aislados del eWAT de ratones jóvenes y envejecidos, pero no se encontraron diferencias significativas entre ambos grupos (Figura 6).

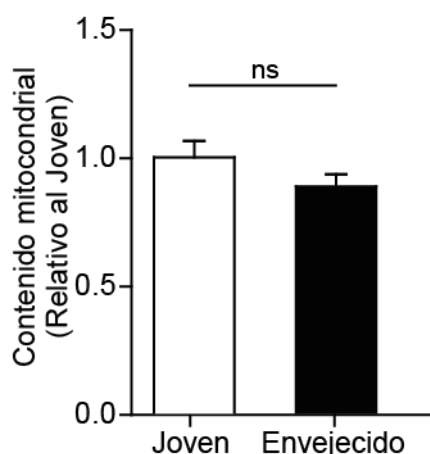


Figura 6. Contenido mitocondrial en adipocitos blancos.

Se analizó el contenido mitocondrial (cantidad de ADN mitocondrial frente a cantidad de ADN genómico) en ratones jóvenes y envejecidos. Los valores representan la media \pm error estándar. Para el análisis estadístico se aplicó T-Student (ns significa diferencia no significativa).

En segundo lugar, se analizó la expresión de marcadores de diferentes complejos de la cadena de transporte de electrones (ETC) en adipocitos aislados del eWAT de ratones jóvenes y envejecidos. Tanto las imágenes de western blot (Figura 7A), como las cuantificaciones los mismos (Figura 7B) muestran que los niveles de expresión de la subunidad 9 del subcomplejo 1 alfa de la NADH deshidrogenasa (NDUFA9; complejo I), la subunidad A del complejo succinato deshidrogenasa (SDHA; complejo II), la proteína nuclear 1 de la ubiquinol-citocromo c reductasa (UQCRC1; complejo III) y el canal dependiente de la tensión de aniones 1 (VDAC1) no se alteraban significativamente durante el envejecimiento. Sin embargo, la expresión de la subunidad Vb de la citocromo c oxidasa (COX5B; complejo IV) se veía reducida de manera muy significativa en los adipocitos blancos de ratones envejecidos y, además, esta disminución en la expresión de COX5B se tradujo en una disminución en la actividad del complejo IV (Figura 7C).

En conjunto, estos datos indican que la disminución en la expresión y actividad del complejo IV correlaciona con la expansión del eWAT asociada a la edad.

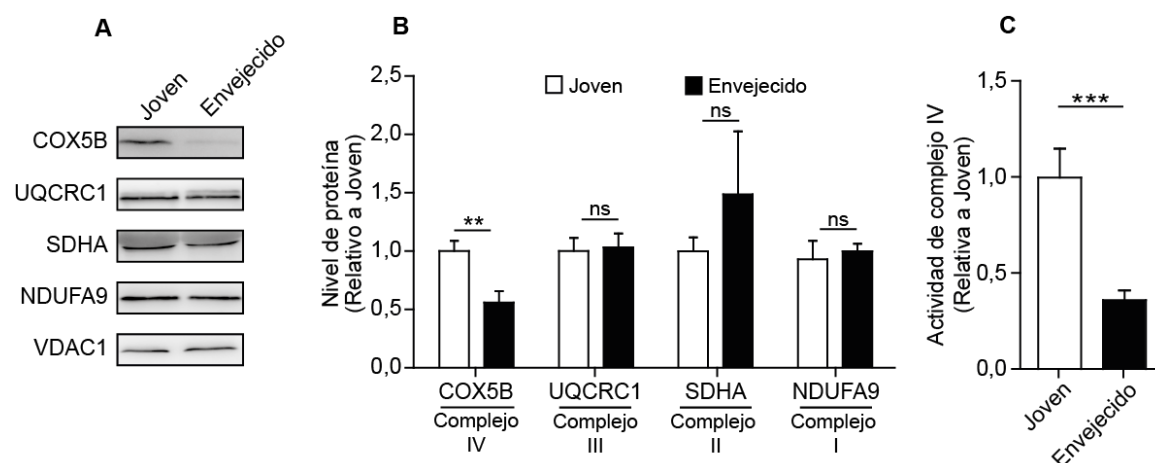


Figura 7. La cantidad y actividad del complejo IV disminuye en adipocitos blancos de ratones envejecidos.

(A) Western blot representativo y (B) cuantificación de los niveles de expresión de diferentes subunidades de complejos mitocondriales COX5B, UQCRC1, SDHA, NDUFA9 y VDAC1 en adipocitos aislados de eWAT de ratones jóvenes ($n=12$) y envejecidos ($n=10$). La cuantificación de western blot se llevó a cabo mediante el software ImageJ. (C) Actividad del complejo IV en adipocitos aislados de eWAT de ratones jóvenes ($n=6$) y envejecidos ($n=10$). Los valores representan la media \pm error estándar. Para el análisis estadístico se aplicó T-Student (**, $p<0,01$;***, $p<0,001$; ns significa diferencia no significativa).

Por último, con el objetivo de determinar si la disminución del complejo IV asociada a la expansión del eWAT implicaba variaciones en la expresión de todas sus subunidades, se analizaron los niveles de ARNm de las 10 subunidades de complejo IV codificadas en el núcleo (Figura 8). Sorprendentemente no todas ellas se afectaban por igual, sino que los niveles de expresión de *Cox5b*, *Cox8a*, *Cox6c* y *Cox6a1* se veían reprimidos durante el envejecimiento; mientras que el del resto de subunidades permanecía sin cambios (Figura 8).

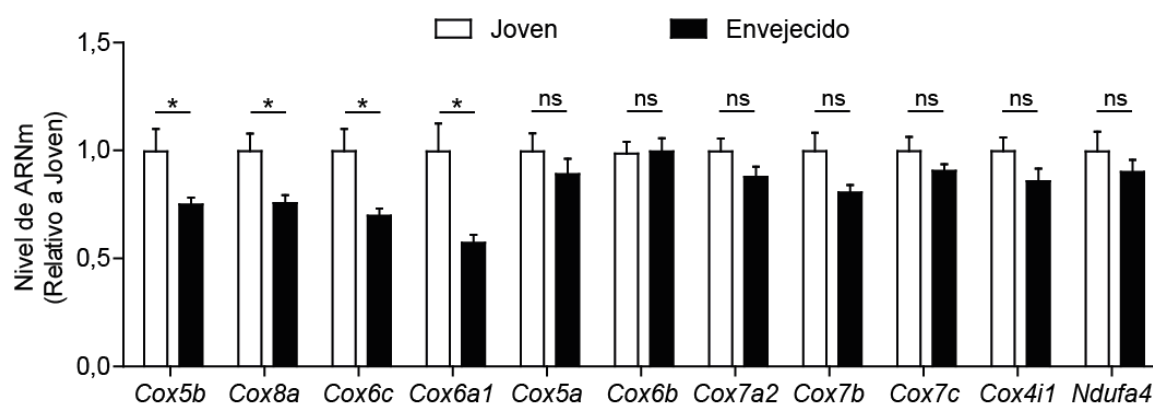


Figura 8. *Cox5b*, *Cox8a*, *Cox6c* y *Cox6a1* son más sensibles al envejecimiento en adipocitos que el resto de subunidades del complejo IV.

Análisis de niveles de ARNm mediante RT-PCR de las 10 subunidades de complejo IV codificadas en el núcleo en adipocitos aislados del eWAT de ratones jóvenes y envejecidos ($n=7$). Los valores representan la media \pm error estándar. Para el análisis estadístico se aplicó T-Student (*, $p<0,05$; ns significa diferencia no significativa).

En conjunto, estos resultados indican que no todos los componentes mitocondriales son igual de sensibles a la expansión del WAT asociada a la edad, siendo el complejo IV especialmente sensible al envejecimiento en adipocitos blancos y, más concretamente, 4 de sus subunidades: *Cox5b*, *Cox8a*, *Cox6a1* y *Cox6c*.

4.2. PAPEL DE HIF1A EN LA REPROGRAMACIÓN MITOCONDRIAL ASOCIADA A LA EDAD.

En los últimos años, se han publicado numerosos estudios en los que se demuestra el papel de HIF1A en la progresión de la obesidad inducida por HFD (Halberg et al., 2009; Jiang et al., 2011; Kihira et al., 2014; Krishnan et al., 2012; Lee et al., 2011; Sun et al., 2013a). Al margen de estos estudios, también se ha demostrado mediante tinción con pimonidazol (Hosogai et al., 2007; Lee et al., 2011; Lee et al., 2014b; Ye et al., 2007) y mediante western blot (Krishnan et al., 2012; Lee et al., 2014b; Ye et al., 2007), la existencia de focos hipóxicos (y consiguiente estabilización de HIF1A) en el WAT de ratones mantenidos con HFD. Por tanto, nos preguntamos si HIF1A pudiera estar contribuyendo a la represión del complejo IV asociada a la edad en el WAT.

4.2.1. HIF1A SE ESTABILIZA EN EL eWAT DURANTE LA GANANCIA DE PESO ASOCIADA A LA EDAD

Con el fin de explorar si HIF1A se estabiliza con la edad en el eWAT, se compararon mediante western blot los niveles de HIF1A de ratones jóvenes y envejecidos. Los

resultados muestran que la estabilización basal de HIF1A que se detecta en ratones jóvenes se ve incrementada durante la expansión del WAT asociada a la edad, de modo que los niveles de HIF1A en ratones envejecidos son mucho mayores que en ratones jóvenes (Figura 9A). Sin embargo, no se detectó HIF1A en otros tejidos analizados de ratones jóvenes ni envejecidos, como BAT e hígado (Figura 9B y C), indicando que la estabilización de HIF1A en el eWAT puede ser un factor determinante durante la ganancia de peso asociada a la edad.

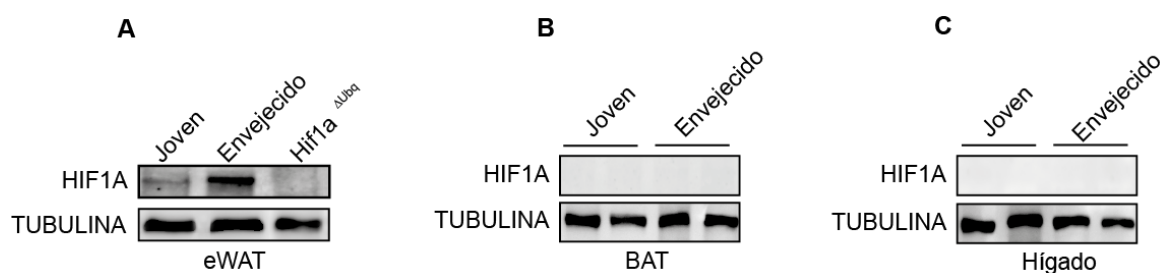


Figura 9. HIF1A se estabiliza en el eWAT durante el envejecimiento.

Western blot representativo de los niveles de HIF1A en (A) eWAT, (B) BAT e (C) hígado de ratones jóvenes y envejecidos.

4.2.2. MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DEL PAPEL DE HIF1A EN LA GANANCIA DE PESO ASOCIADA A LA EDAD

Para estudiar el papel de HIF1A durante la expansión del WAT se han empleado dos modelos animales: (i) uno en el que se deletó *Hif1a* en ratones adultos de manera ubicua y (ii) un segundo modelo en el que se deletó *Hif1a* específicamente en adipocitos en ratones adultos. En ambos casos, la deletión de *Hif1a* se realizó mediante la eliminación del exón 2 de dicho gen en ratones en los que éste exón se encuentra flaqueado por dos sitios Lox P (*Hif1a*^{floxed}) (Ryan et al., 2000). Para la deletión ubicua de *Hif1a* se emplearon ratones transgénicos ubiquitina-Cre-ER^{T2} (*Hif1a*^{ΔUbq}) en los cuales la expresión de la recombinasa Cre-ER^{T2} está bajo el control del promotor del gen de la *Ubiquitina*, mientras que para eliminar *Hif1a* de manera específica en adipocitos se emplearon ratones transgénicos adiponectina-Cre-ER^{T2} (*Hif1a*^{ΔAdipo}) en los cuales el promotor que controla la expresión de la recombinasa es del gen de la *Adiponectina*, que se expresa únicamente en adipocitos maduros (Sassmann et al., 2010). La inactivación génica se llevó a cabo mediante la administración 4-hidroxi-tamoxifeno (tamoxifeno), el cual promueve la traslocación al núcleo de la recombinasa Cre-ER^{T2}, donde reconoce los sitios Lox P que flanquean el exón 2 de *Hif1a*, provocando su escisión por recombinación homologa (Figura 10) (Miro-Murillo et al., 2011) (para más detalles ver apartado de Materiales y Métodos).

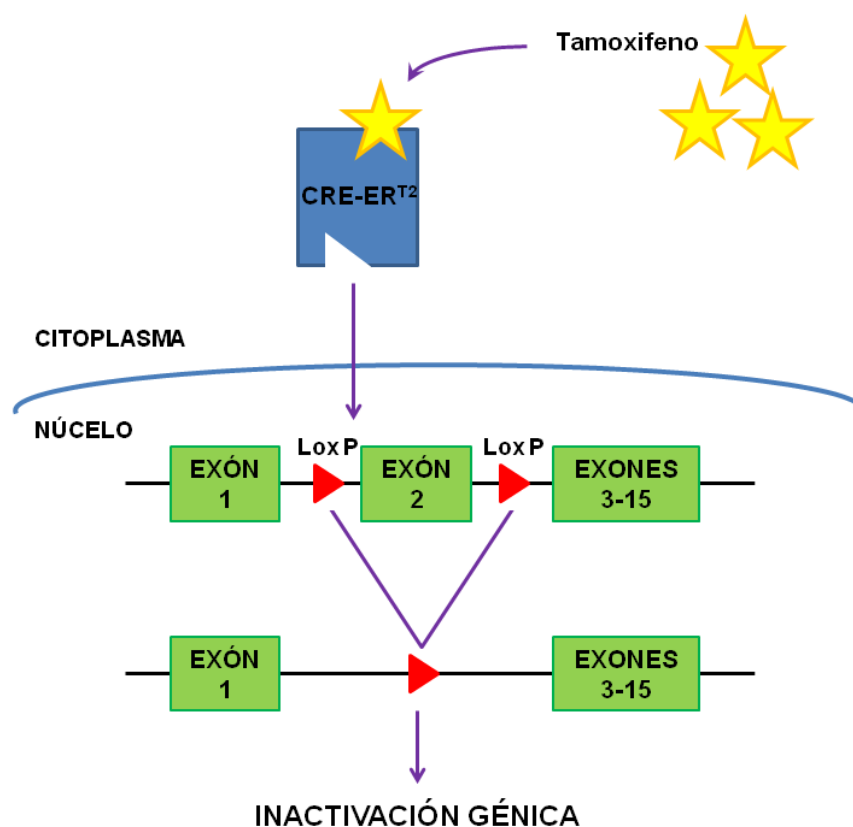


Figura 10. Generación de ratones deficientes para *Hif1a*. Modelo de actuación del tamoxifeno.

La administración de tamoxifeno permite la traslocación de la Cre-ER^{T2} recombinasa al núcleo que provoca la recombinación y delección del ADN flanqueado por los sitios lox P en los ratones *Hif1a*^{floxed}-UBC-Cre-ER^{T2} y *Hif1a*^{floxed}-AdipoQ-Cre-ER^{T2}, causando la inactivación génica por delección del exón 2.

Para confirmar el buen funcionamiento de ambos modelos, tras la administración de tamoxifeno en la dieta a estos animales (para más detalles ver Materiales y Métodos), se procedió a analizar los niveles de expresión de ARNm de *Hif1a* en varios tejidos. En el caso de los ratones *Hif1a*^{ΔUbq}, se obtuvo una delección mayor del 90% en todos los tejidos analizados (Figura 11A), mientras que en los ratones *Hif1a*^{ΔAdipo} se obtuvieron unos niveles de delección similares pero únicamente en WAT y BAT (Figura 11B).

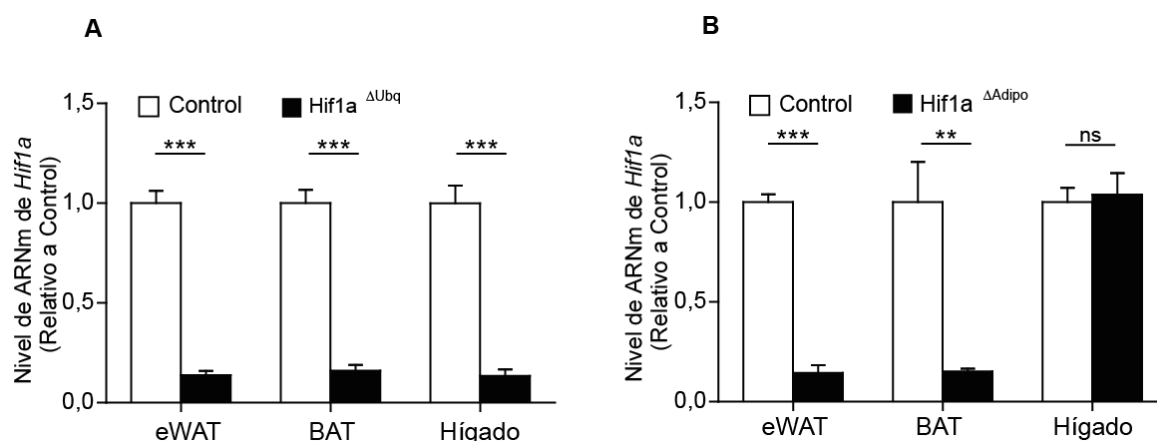


Figura 11. Niveles de deleción de *Hif1a* en los diferentes modelos animales empleados.

Análisis de los niveles de ARNm mediante RT-PCR del *Hif1a* en eWAT, BAT e hígado en ratones control (n=16) y ratones *Hif1a*^{ΔUbq} (n=13) tras el tratamiento con tamoxifeno. (B) Análisis de los niveles de ARNm mediante RT-PCR del *Hif1a* en eWAT, BAT e hígado en ratones control (n=8) y ratones *Hif1a*^{ΔAdipo} (n=6) tras el tratamiento con tamoxifeno. Los valores representan la media ± error estándar. Para el análisis estadístico se aplicó T-Student (***, p<0,001; ns significa diferencia no significativa).

En conjunto, con estos datos se validaron ambos sistemas de deleción de *Hif1a* mediante la administración de tamoxifeno en la dieta para poder explorar del papel de HIF1A en la obesidad asociada a la edad.

4.2.3. LOS RATONES DEFICIENTES PARA *Hif1a* SON RESISTENTES A LA GANANCIA DE PESO ASOCIADA A LA EDAD

En primer lugar se hizo un estudio de la ganancia de peso asociada a la edad, tanto en ratones deficientes para *Hif1a* de manera ubicua (*Hif1a*^{ΔUbq}), como en sus correspondientes controles (Figura 12). Mientras que los ratones control ganaban peso según lo descrito en la Figura 4 al cabo de 10-12 meses, los ratones *Hif1a*^{ΔUbq} ganaron menos peso en el mismo periodo de tiempo (Figura 12A) a pesar de que la ingesta fue similar en ambos grupos (Figura 12C). En consecuencia, los ratones control alcanzaron los 42,15 ± 3,57 g al cabo de 10-12 meses, mientras que los ratones deficientes para *Hif1a* pesaban 34,17 ± 1,06 g (Figura 12B).

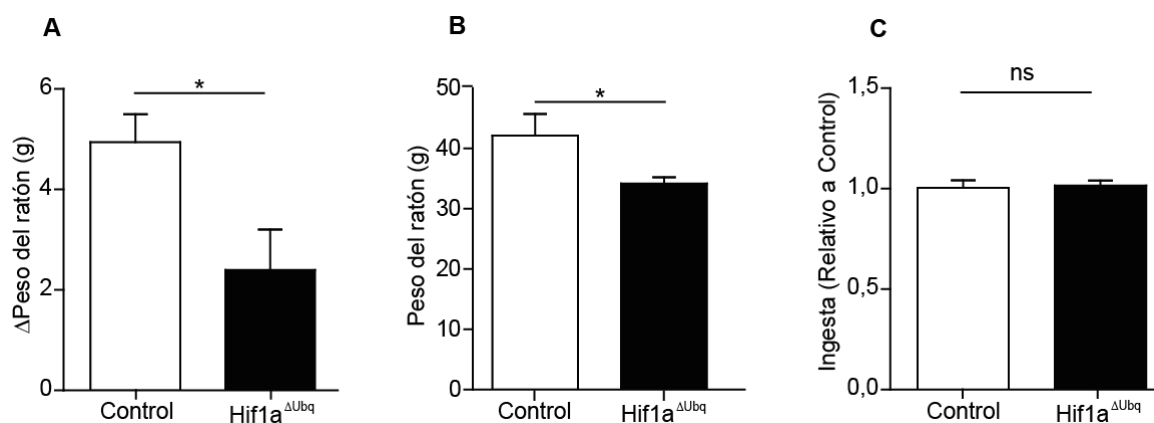


Figura 12. La delección de *Hif1a* previene la ganancia de peso asociada a la edad.

(A) Ganancia de peso en ratones *Hif1a*^{ΔUbq} (n=10) y ratones control (n=7) después del tratamiento con tamoxifeno. (B) Peso de los ratones *Hif1a*^{ΔUbq} (n=7) y ratones control (n=6) a los 10-12 meses de edad. (C) Ingesta de ratones *Hif1a*^{ΔUbq} (n=9) y ratones control (n=10). Los valores representan la media ± error estándar. Para el análisis estadístico se aplicó T-Student (*, p<0,05; ns significa diferencia no significativa).

Además, el peso del eWAT de los ratones deficientes para *Hif1a*, así como el tamaño de sus adipocitos era mucho menor que el de los ratones control (Figura 13); indicando que *Hif1a* juega un papel esencial en el control del tamaño de los adipocitos y la expansión del WAT asociada a la edad.

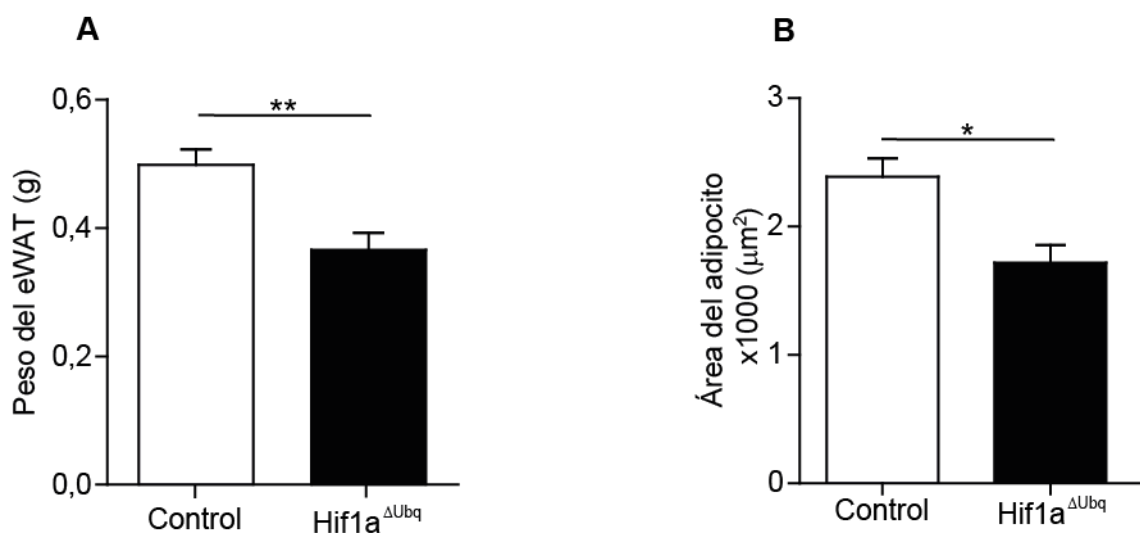


Figura 13. La delección de *Hif1a* previene expansión del WAT asociada a la edad.

(A) Peso del eWAT de ratones *Hif1a*^{ΔUbq} (n=8) y ratones control (n=14). (B) Media del tamaño de adipocitos del eWAT de ratones *Hif1a*^{ΔUbq} (n=4) y ratones control (n=6). Los valores representan la media ± error estándar. Para el análisis estadístico se aplicó T-Student (*, p<0,05; **, p<0,001).

4.2.4. LA AUSENCIA DE *Hif1a* ESPECÍFICAMENTE EN ADIPOCITOS PREVIENE LA GANANCIA DE PESO ASOCIADA A LA EDAD.

A fin de determinar la importancia de la estabilización de HIF1A en los adipocitos durante la ganancia de peso asociada a la edad, se empleó el modelo animal adiponectina-Cre-ER^{T2} que permite deleciónar *Hif1a* de manera específica en adipocitos. Los ratones deficientes en *Hif1a* específicamente en adipocitos, al igual que en los que se eliminó de manera ubicua, ganaron menos peso tras la administración de tamoxifeno y, en consecuencia, el peso de los ratones y del eWAT al los 8-10 meses, así como el tamaño de los adipocitos, era menor que en los ratones control (Figura 14).

Estos datos indican que, la sola deleción de *Hif1a* de manera específica en adipocitos es capaz de revertir la ganancia de peso y el incremento en el tamaño de los adipocitos asociados a la edad, y confirma la relevancia de la estabilización de HIF1A en los adipocitos para el control de la expansión del WAT.

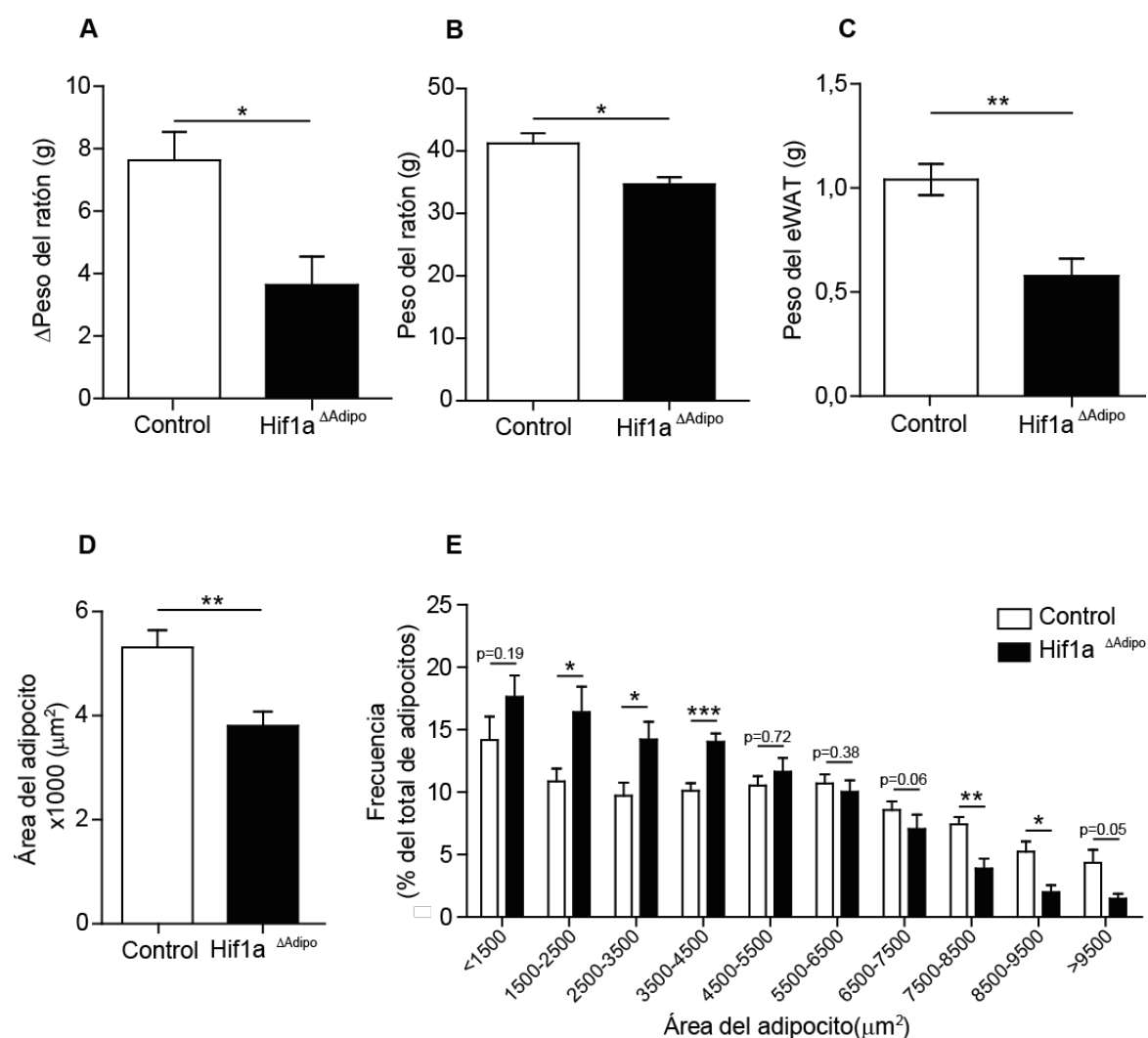


Figura 14. La delección de *Hif1a* en adipocitos previene la ganancia de peso y la expansión del WAT asociadas a la edad.

(A) Ganancia de peso en ratones Hif1a Δ Adipo (n=6) y ratones control (n=8) después del tratamiento con tamoxifeno. (B) Peso de los ratones Hif1a Δ Adipo (n=6) y ratones control (n=8) a los 8-10 meses de edad. (C) Peso del eWAT de ratones Hif1a Δ Adipo (n=6) y ratones control (n=8). (D) Media del tamaño de adipocitos y (E) distribución de frecuencias de tamaños de adipocitos en el WAT de ratones Hif1a Δ Adipo (n=6) y ratones control (n=8). Los valores representan la media \pm error estándar. Para el análisis estadístico se aplicó T-Student (*, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001; ns significa diferencia no significativa).

4.2.5. LA DELECCIÓN DE *Hif1a* PREVIENE LA REPRESIÓN DEL COMPLEJO IV EN RATONES ENVEJECIDOS.

Con el objetivo de determinar si HIF1A está implicado en la represión de complejo IV asociada a la edad en adipocitos, se realizó un análisis por western blot para determinar la cantidad de complejo IV en ratones deficientes en *Hif1a* y sus respectivos controles, utilizando la expresión de COX5B como marcador de dicho complejo (al igual que en la Figura 7). Los resultados demuestran que la represión de la cantidad de complejo IV

asociada a la edad no tiene lugar en adipocitos aislados de eWAT de ratones envejecidos deficientes para *Hif1a*, indicando que la represión del complejo IV asociada a la edad en adipocitos es dependiente de HIF1A (Figura 15A). En este sentido, para profundizar en la implicación de la estabilización de HIF1A en la reprogramación mitocondrial asociada a la edad se analizó la expresión a nivel de ARNm de aquellas subunidades de complejo IV que previamente se identificaron como las más sensibles al envejecimiento (*Cox5b*, *Cox6a1*, *Cox6c* y *Cox8a*). De todas, ellas únicamente *Cox5b* y *Cox8a* recuperaban sus niveles en adipocitos aislados de eWAT de ratones envejecidos deficientes en *Hif1a* (Figura 15B), indicando que no todas las subunidades del complejo IV son igualmente sensibles la estabilización de HIF1A en adipocitos.

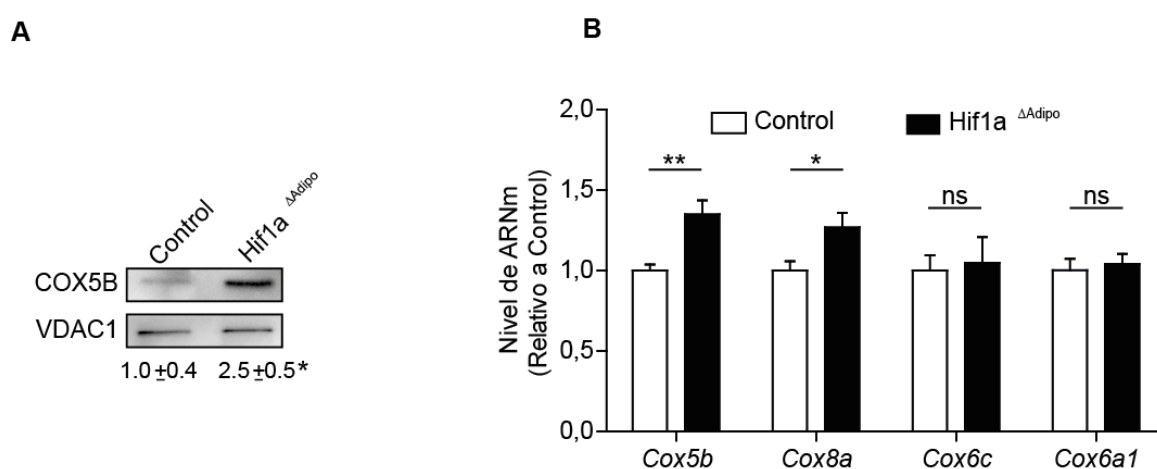


Figura 15. HIF1A controla la expresión de algunas subunidades del complejo IV durante el envejecimiento.

(A) Western blot representativo y cuantificación de los niveles de COX5B (marcador de complejo IV) en adipocitos aislados del eWAT de ratones *Hif1a*^{ΔAdipo} (n=6) y ratones control (n=5). La expresión de COX5B se normalizó respecto a la de VDAC1 y se relativizó respecto a los valores de los ratones control. (B) Niveles de expresión de ARNm de *Cox5b*, *Cox8a*, *Cox6c* y *Cox6a1* en adipocitos aislados de eWAT de ratones *Hif1a*^{ΔAdipo} (n=6) y ratones control (n=5). Los valores representan la media ± error estándar. Para el análisis estadístico se aplicó T-Student (*, p<0,05; **, p<0,01; ***, p<0,001; ns significa diferencia no significativa).

En conclusión, todos estos datos identifican a HIF1A con un factor esencial en la ganancia de peso asociada a la edad mediante la represión de algunas subunidades del complejo IV durante el envejecimiento en adipocitos blancos.

4.2.6. HIF1A REGULA LA EXPRESIÓN DE COX5B VIA c-MYC

Puesto que HIF1A está implicado en la represión de *Cox5b* y *Cox8a* asociada a la edad quisimos profundizar en los mecanismos moleculares involucrados en esta regulación. Aunque en los últimos años se han identificado algunos genes reprimidos directamente

por unión de HIF1A a su región promotora (Erler et al., 2004; Gao et al., 2013; Narravula and Colgan, 2001; Xi et al., 2014), hasta el momento se sabe poco a cerca de la forma en que HIF1A puede mediar la represión de genes. Una de las posibilidades, a la que se ha prestado más atención, implica la capacidad de HIF1A para reprimir la actividad del factor de transcripción c-MYC. De hecho, HIF1A puede desplazar a c-MYC de la región promotora de algunos genes y, por tanto, provocar una disminución en la transcripción de los mismos (Gordan et al., 2007). En este sentido, se ha descrito que NRF1 se une al promotor de todas las subunidades del complejo IV codificadas en el núcleo (Dhar et al., 2008) y concretamente, el sitio de unión a NRF1 del promotor de *Cox5b* contiene además un sitio de unión de c-MYC (Morrish et al., 2003) que no está presente en el resto de subunidades (Tabla 2).

GENE	POSITION (Start / End)	SEQUENCE (5' - 3')
<i>Cox5b</i>	-51 / -36	ACT GCGCATGTG CGG
<i>Cox8a</i>	-755 / -744	GTGG GCGCATG CCTT
<i>Cox6c</i>	+ 55 / +69	CTTGCGCATGCGT
<i>Cox6a1</i>	-142 / -129	GGGG GCGCATG GCGC
<i>Cox5a</i>	-76 / -62	CGAC GCGCATG GCGC
<i>Cox7a2</i>	-61 / -41	CGG GCGCAGG GCGC
<i>Cox7b</i>	+91 / +106	GCAG CAGCATAG TCG
<i>Cox7c</i>	-419 / -405	GCTGCGCATAGGAG
<i>Cox4i</i>	-253 / -238	CGCCGGG CATG CGCA

Tabla 2. Sitios de unión NRF1 en el promotor de las subunidades del complejo IV codificadas en el núcleo.

Posición, respecto al sitio de inicio de transcripción, de los sitios de unión de NRF1 (en negrita) en el promotor proximal de las subunidades de complejo IV murinas codificadas en el núcleo (basado en Dhar et al. y Morrish et al.). El sitio de unión de c-MYC canónico sólo está presente en la región reguladora de *Cox5b* (indicado en rojo y subrayado).

Con el objetivo de estudiar si c-MYC se une realmente al promotor proximal de *Cox5b*, se hicieron ensayos de inmunoprecipitación de cromatina (ChIP) en fibroblastos embrionarios de ratón (MEF), un modelo celular ampliamente empleado para el estudio *in vitro* de mecanismos moleculares relacionados con la regulación de c-MYC por parte de HIF1A y la hipoxia (Mack et al., 2005). Para ello, se empleó un anticuerpo anti c-MYC y se diseñaron oligonucleótidos para detectar la región del promotor de *Cox5b* donde se localiza el sitio c-MYC (y NRF1) y para una región distal del mismo promotor, que sirvió de control negativo (Figura 16).

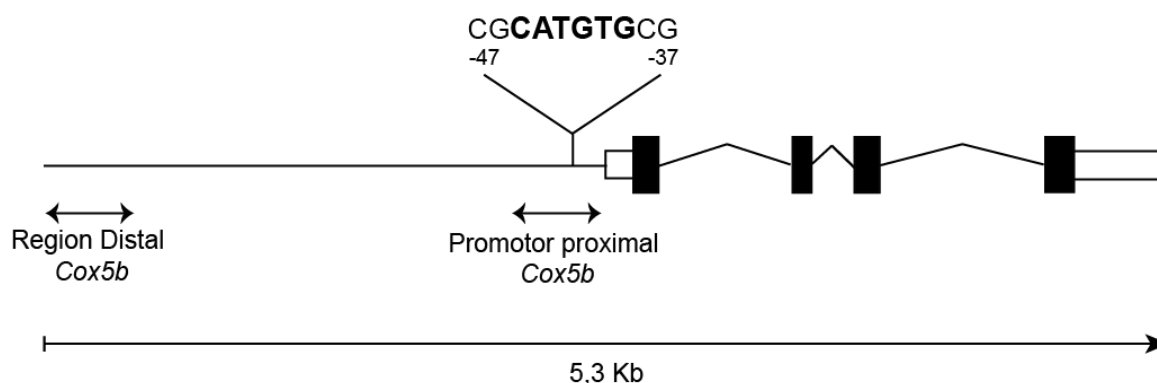


Figura 16. Representación esquemática del gen y el promotor murino de *Cox5b*.

En la representación se indica la localización de las regiones distal y proximal donde fueron diseñados los oligonucleótidos para los ensayos de ChIP. La secuencia de nucleótidos correspondiente al sitio de unión de c-MYC está señalada en negrita.

Como se muestra en la Figura 17, c-MYC se une de manera específica al promotor proximal de *Cox5b* y dicha unión se pierde en condiciones de hipoxia. Además, esta regulación es específica para *Cox5b* puesto que no se detectó unión significativa de c-MYC al promotor de *Cox8a* (la otra subunidad especialmente sensible a la estabilización de HIF1A).

Estos datos sugieren que *Cox5b* se reprime selectivamente durante el envejecimiento en adipocitos blancos mediante un mecanismo dependiente de la interacción entre HIF1A y c-MYC, desvelando a este gen como uno de los genes de respuesta primaria a la estabilización de HIF1A en el eWAT durante el envejecimiento.

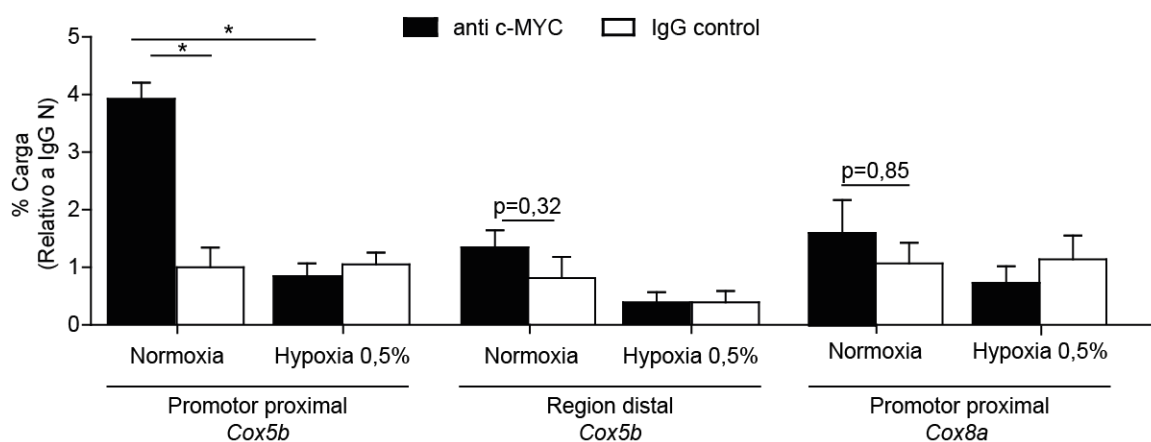


Figura 17. La hipoxia impide a unión de c-MYC al promotor proximal de *Cox5b*.

Resultado de los ensayos de ChIP realizados con el objetivo de determinar la unión de c-MYC a la región proximal y distal promotor de *Cox5b*, así como a la región promotora de *Cox8a* en MEF expuestos a condiciones de Normoxia o Hipoxia 0,5% durante 18-20 h (n = 3 experimentos independientes). Los valores representan la media \pm error estándar. Para el análisis estadístico se aplicó T-Student (*, $p < 0,05$).

4.3. EFECTOS FUNCIONALES DEL SILENCIAMIENTO DE *COX5B* *IN VITRO* E *IN VIVO*.

Puesto que, en contra posición al resto de subunidades del complejo IV, la expresión de *Cox5b* se regula de manera primaria durante el envejecimiento por la interacción de HIF1A/c-MYC, y esta subunidad se ha identificado como una de las más esenciales para el mantenimiento de la actividad y estabilidad de complejo IV (Galati et al., 2009; Prabu et al., 2006), decidimos continuar el estudio de papel del complejo IV en la biología del adipocito blanco y la obesidad modulando los niveles de expresión de *Cox5b* en diferentes modelos tanto *in vivo* como *in vitro*.

4.3.1. EL SILENCIAMIENTO DE *Cox5b* *IN VITRO* ES SUFICIENTE PARA DISMINUIR LA CANTIDAD Y ACTIVIDAD DEL COMPLEJO IV.

Con el objetivo de determinar el potencial del silenciamiento de *Cox5b* para disminuir la actividad y estabilidad del complejo IV, se silenció *Cox5b* en la línea celular de pre-adipocitos inmortalizados 3T3-L1 utilizando lentivirus que contenían un shRNA de interferencia contra *Cox5b* murino (línea celular a la que denominaremos 3T3-L1-shCOX5B). En paralelo se infectaron células con una secuencia control shSCR (línea celular a la que denominaremos 3T3-L1-shSCR).

Tras corroborar que el silenciamiento de *Cox5b* había sido efectivo tanto a nivel de ARNm como a nivel de proteína (Figura 18), se llevaron a cabo estudios funcionales para medir la estabilidad y actividad del complejo IV en estas células. En primer lugar, mediante técnicas de Blue Native-PAGE en mitocondrias aisladas, se analizó el ensamblaje del complejo IV (y el complejo II, como control) en células 3T3-L1-shSCR y 3T3-L1-shCOX5B a fin de determinar si la estabilidad del complejo IV se veía afectada en las células silenciadas. Las células con silenciamiento de *Cox5b* mostraron menor cantidad de complejo IV ensamblado que las células control, mientras que los niveles de complejo II permanecían sin cambios (Figura 19A). Ésta inestabilidad del complejo IV se tradujo en una disminución en la cantidad absoluta de otras subunidades del complejo IV por western blot (Figura 19B).

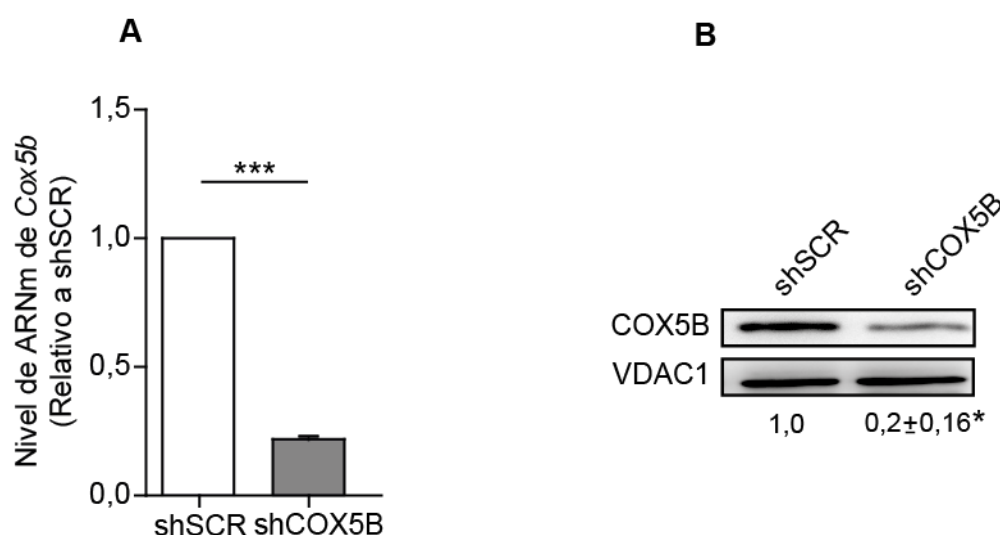


Figura 18. Nivel de silenciamiento de *Cox5b* en células 3T3-L1-shCOX5B.

(A) Nivel de expresión de ARNm de *Cox5b* en células 3T3-L1-shCOX5B relativo a las células control 3T3-L1-shSCR (n=3 experimentos independientes). (B) Western blot representativo y cuantificación (n=3 experimentos independientes) de los niveles de COX5B en células 3T3-L1-shCOX5B y en células control 3T3-L1-shSCR. La expresión de COX5B se normalizó respecto a la de VDAC1 y se relativizó respecto a los valores de las células control. Los valores representan la media \pm error estándar. Para el análisis estadístico se aplicó T-Student (*, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$).

En segundo lugar, a fin de determinar el alcance de esta disminución en la cantidad de complejo IV, se midió la actividad de dicho complejo en las células silenciadas. Comparado con las células control, las células con 3T3-L1-shCOX5B tenían menor actividad del complejo IV (Figura 19C) de modo que, el silenciamiento de *Cox5b* es suficiente para comprometer la estabilidad del complejo IV y disminuir su actividad en este modelo celular.

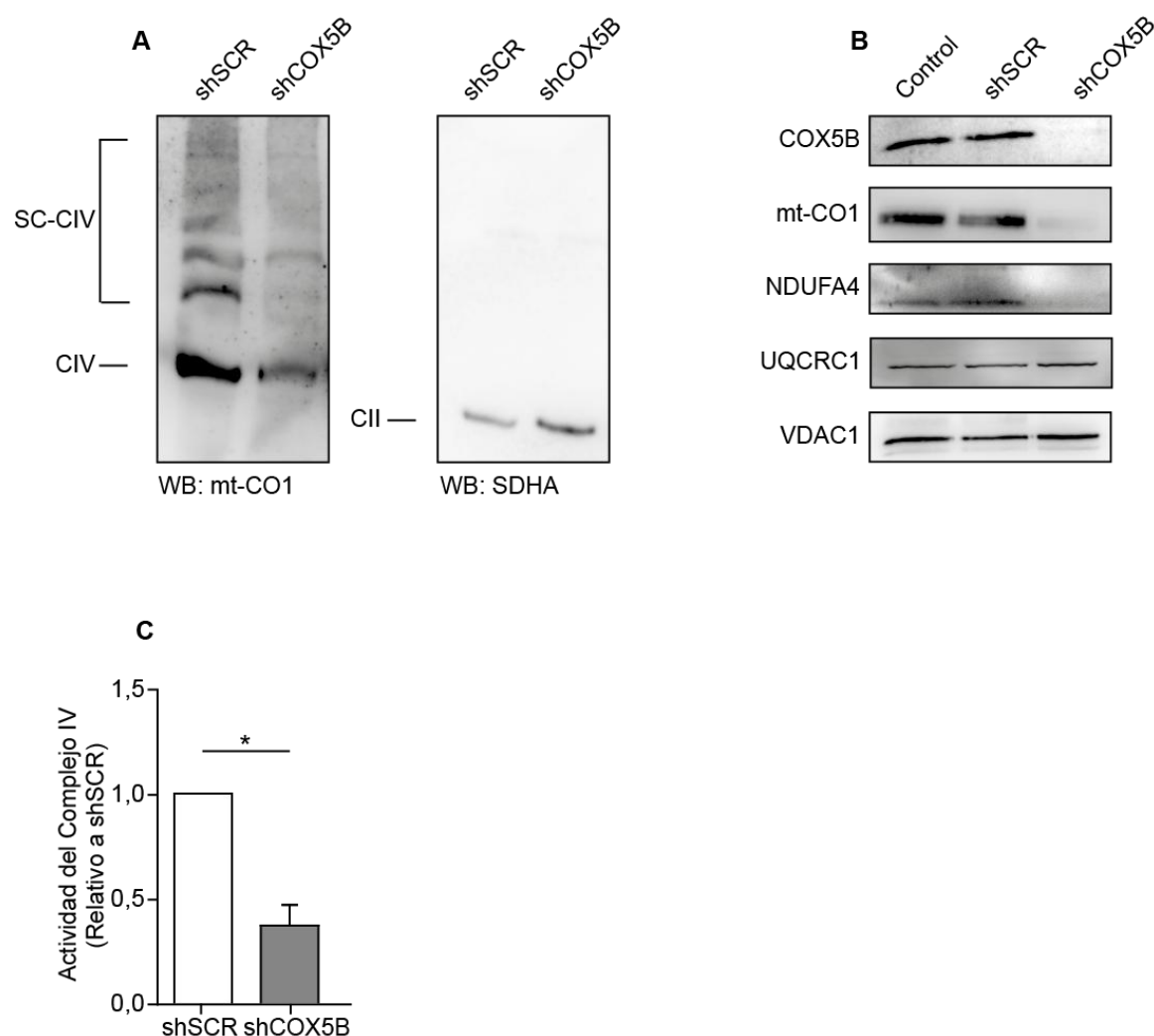


Figura 19. El silenciamiento de *Cox5b* disminuye la estabilidad y la actividad del complejo IV.

(A) Imagen representativa de western blot BN-PAGE en células 3T3-L1-shCOX5B y en células control 3T3-L1-shSCR del complejo IV (CIV) y los super-complejos en de los que forma parte (SC-CIV) (en la parte izquierda), y del complejo II (CII) (en la parte derecha). Para identificar el complejo IV, se empleó mt-Co1, y para identificar el complejo II, SDHA. (B) Western blot representativo de los niveles de diferentes componentes del complejo IV (COX5B, mt-CO1 y NDUFA4) y complejo III (UQCRC1) en células 3T3-L1-shCOX5B y en células control 3T3-L1-shSCR. VDAC1 se empleó como control de carga. (C) Actividad de complejo IV en células 3T3-L1-shCOX5B y en células control 3T3-L1-shSCR (n=3 experimentos independientes). Los valores representan la media \pm error estándar. Para el análisis estadístico se aplicó T-Student (*, $p < 0,05$).

En conjunto, los datos identifican a COX5B como una subunidad esencial para controlar la actividad y ensamblaje del complejo IV, así como la estabilidad del resto de componentes del complejo IV, de modo que COX5B puede ser una herramienta útil para controlar la actividad y estabilidad del complejo IV *in vitro*. Quizá por esta importancia de COX5B para el complejo IV, su represión primaria ejecutada por HIF1A sea suficiente para modular la actividad de este complejo durante el envejecimiento.

4.3.2. EL SILENCIAMIENTO DE *Cox5b* IN VITRO DISMINUYE LA OXIDACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS Y PROMUEVE LA ACUMULACIÓN DE LÍPIDOS.

Posteriormente, nos planteamos si esta represión de COX5B, y por tanto del complejo IV, que tiene lugar durante el envejecimiento promueve la acumulación de lípidos y el incremento en el tamaño de adipocitos asociados a la edad. Para explorar esta posibilidad, se llevaron a cabo estudios funcionales *in vitro* que permitieran relacionar directamente la disminución en la actividad del complejo IV con un mayor acúmulo de lípidos intracelulares. En este sentido, mediante la tinción de lípidos con Rojo Nilo constatamos que aquellas células con silenciamiento de *Cox5b* presentaban mayor cantidad de lípidos intracelulares que las células control, indicando que una disminución en la actividad del complejo IV promueve una mayor acumulación de lípidos intracelulares (Figura 20A). Para confirmar esta hipótesis se trataron las células control con un inhibidor del complejo IV, como es la azida, obteniéndose niveles similares de tinción con Rojo Nilo que en las células silenciadas (Figura 20A). A la vista de estos resultados, podemos afirmar que la inhibición del complejo IV, ya sea utilizando inhibidores farmacológicos o mediante el silenciamiento de *Cox5b*, favorece la acumulación de lípidos *in vitro*.

De manera complementaria, puesto que previamente se ha relacionado una reducción en la oxidación de ácidos grasos con un incremento en la acumulación de lípidos (Kusminski et al., 2012; Kusminski and Scherer, 2012; Vernochet et al., 2012), se midió la oxidación de ácidos grasos en células 3T3-L1-shCOX5B y en células 3T3-L1-shSCR tratadas o sin tratar con azida. Tanto las células 3T3-L1-shCOX5B, como las células control tratadas con azida presentan una capacidad de oxidación de ácidos grasos mucho menor que las células control (Figura 20B), lo que podría explicar el incremento en la acumulación de lípidos observado anteriormente.

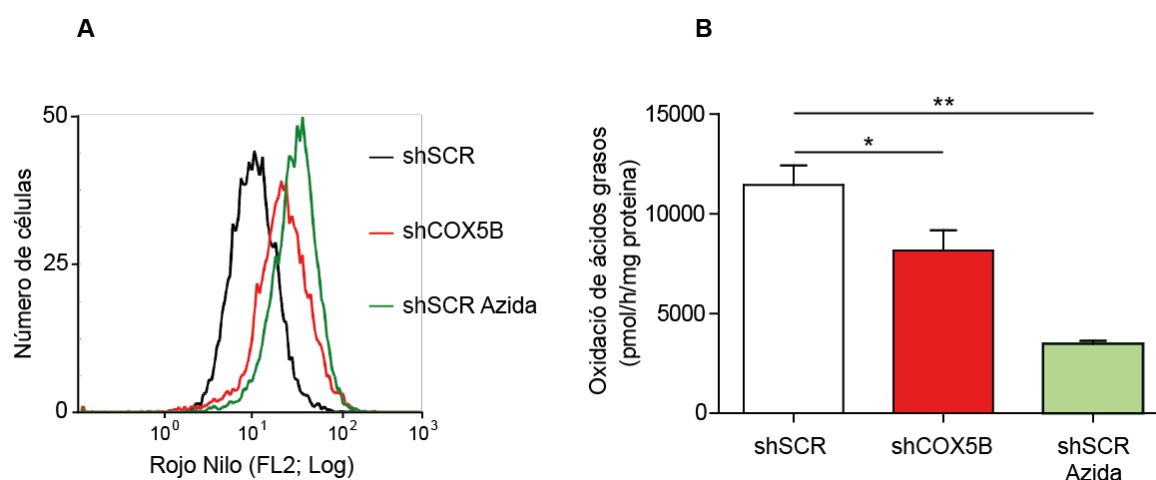


Figura 20. El silenciamiento de *Cox5b* promueve la acumulación de lípidos y disminuye la oxidación de ácidos grasos *in vitro*.

(A) Tinción con Rojo Nilo de lípidos intracelulares en células 3T3-L1-shCOX5B (línea roja), en células control 3T3-L1-shSCR (línea negra) y en células control 3T3-L1-shSCR tratadas con Azida 5mM (línea verde). Se muestra un experimento representativo. (B) Oxidación de ácidos grasos en células 3T3-L1-shCOX5B (barra roja; n=6), en células control 3T3-L1-shSCR (barra negra; n=5) y en células control 3T3-L1-shSCR tratadas con Azida 5mM (barra verde; n=6). Los valores representan la media \pm error estándar. Para el análisis estadístico se aplicó T-Student (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$).

En conclusión, estos datos indican que el silenciamiento de *Cox5b in vitro* es suficiente para reducir la oxidación de ácidos grasos y promover la acumulación de lípidos intracelulares por ello, decidimos comprobar si podríamos modular la acumulación de lípidos *in vivo* utilizando el mismo abordaje.

4.3.3. EFECTOS FUNCIONALES DEL SILENCIAMIENTO DE *Cox5b* *IN VIVO*

En base a la utilidad del silenciamiento de *Cox5b* como herramienta para controlar la actividad y estabilidad del complejo IV *in vitro* y su capacidad para aumentar la acumulación de ácidos grasos *in vitro*, nos preguntamos si el silenciamiento de *Cox5b in vivo* podría promover la acumulación de lípidos en los adipocitos de ratones jóvenes. Para ello, utilizamos las mismas partículas lentivirales que se emplearon en los ensayos *in vitro* en células 3T3-L1, las cuales fueron inyectadas directamente en el eWAT de ratones jóvenes. Se inyectaron partículas lentivirales shCOX5B en el eWAT derecho del ratón, mientras que el contralateral izquierdo no se inyectó y se utilizó como control interno del ratón. Se siguió el mismo protocolo para las partículas lentivirales shSCR y se inyectaron ratones independientes con cada construcción (Figura 21A). Los ratones se sacrificaron 15 días después de la operación.

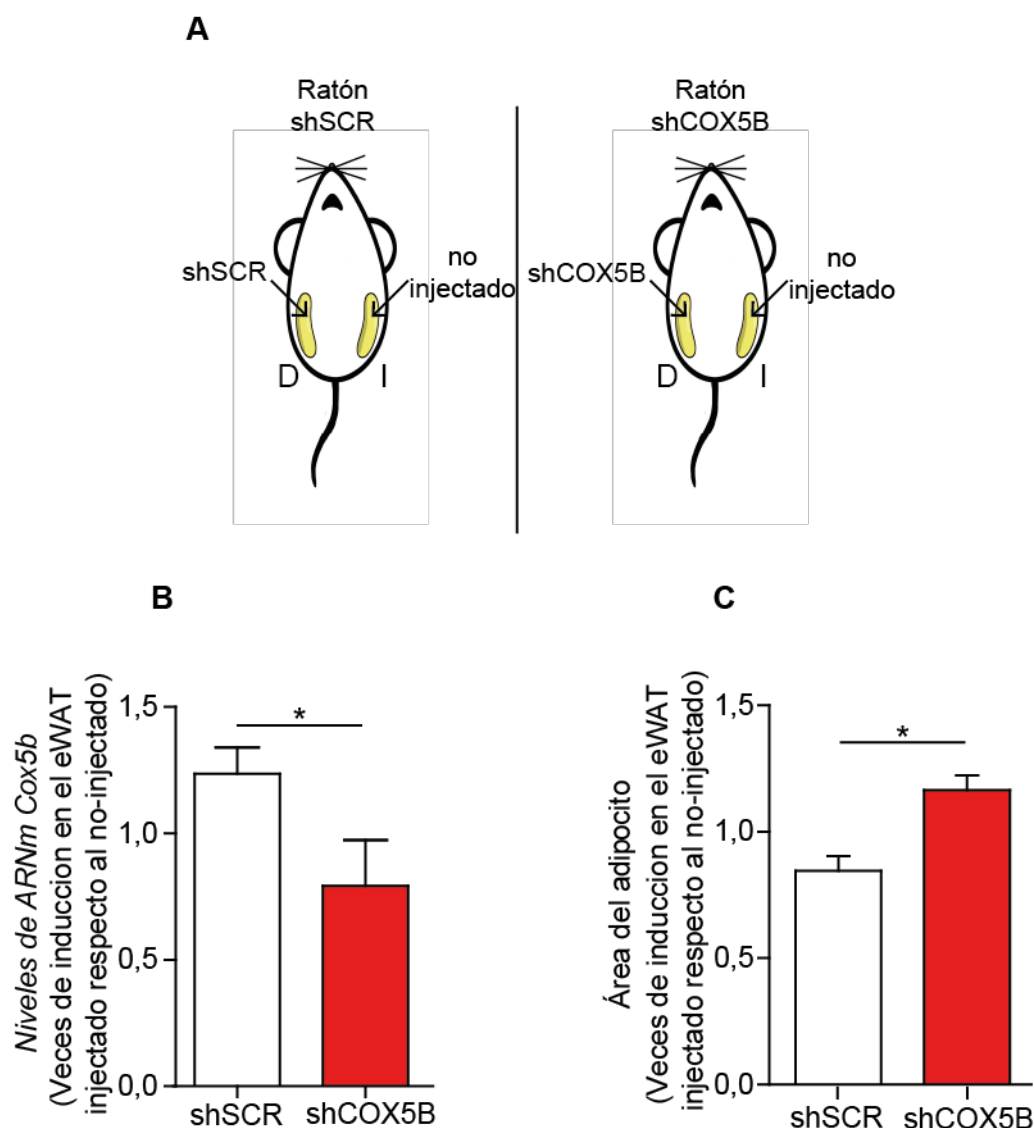


Figura 21. El silenciamiento de *Cox5b* *in vivo* aumenta el tamaño de los adipocitos en ratones jóvenes.

(A) Representación esquemática del protocolo seguido para la inyección de partículas lentivirales shSCR y shCOX5B en ratones jóvenes. (B) Cociente de los niveles de expresión de ARNm de *Cox5b* de los eWAT inyectado frente al no inyectado con shSCR (barra blanca; n=4) y con shCOX5B (barra roja; n=4). (C) Cociente del tamaño medio de los adipocitos en los eWAT inyectado frente al no inyectado con shSCR (barra blanca; n=4) y con shCOX5B (barra roja; n=4). Los valores representan la media \pm error estándar. Para el análisis estadístico se aplicó T-Student (*, $p < 0,05$).

La inyección del shCOX5B *in vivo* redujo significativamente el cociente de expresión de ARNm de *Cox5b* entre el eWAT inyectado/no inyectado cuando se compraba con los ratones inyectados con shSCR (Figura 21B). Además, el cociente de tamaño de los adipocitos entre eWAT inyectado/no inyectado era mayor en los ratones inyectados con shCOX5B que aquellos inyectados con shSCR (Figura 21C). En este sentido, el análisis de distribución de frecuencias de tamaño de adipocitos reveló que, en los ratones

inyectados con shCOX5B la proporción de adipocitos grandes está enriquecida en detrimento de los adipocitos de menor tamaño, cuando se comparan con los inyectados con shSCR (Figura 22A). Por el contrario, al comparar los lados no-inyectados de ambos ratones no se encontraron diferencias significativas en la distribución de frecuencias del tamaño de los adipocitos (Figura 22B).

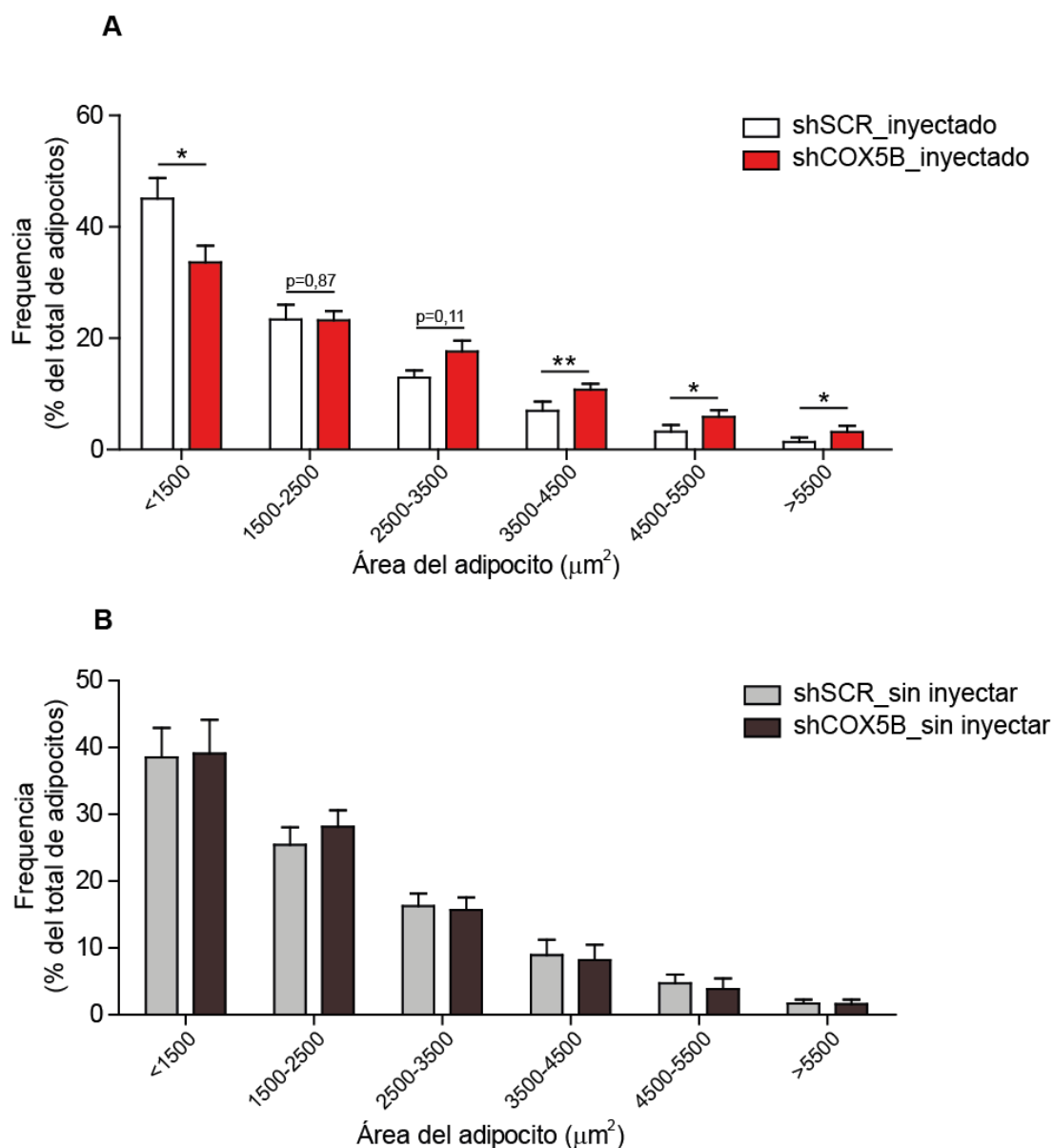


Figura 22. El silenciamiento de *Cox5b* *in vivo* aumenta la proporción de adipocitos de tamaño grande en ratones jóvenes.

(A) Distribución de frecuencias de tamaños de adipocitos en eWAT inyectado del ratón con shCOX5B (barras rojas; n=4) y en el eWAT inyectado del ratón con shSCR (barras blancas; n=4). (B) Distribución de frecuencias de tamaño de adipocitos en eWAT no-inyectado del ratón con shCOX5B (barras marrones; n=4) y en el eWAT no-inyectado del ratón con shSCR (barras grises; n=4). Los valores representan la media \pm error estándar. Para el análisis estadístico se aplicó T-Student (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$).

Como conclusión de todos estos datos, se ha conseguido reducir los niveles de *Cox5b* *in vivo* en el eWAT de ratones jóvenes lo que ha dado lugar a un incremento en el tamaño de sus adipocitos; indicando que la represión de COX5B (y por tanto del complejo IV) está implicada en el control del tamaño de los adipocitos.

4.4. EFECTOS FUNCIONALES DE LA SOBREEXPRESIÓN DE COX5B *IN VIVO* E *IN VITRO*

4.4.1. LA SOBREEXPRESIÓN DE COX5B *IN VITRO* ES SUFICIENTE PARA AUMENTAR LA CANTIDAD Y ACTIVIDAD DEL COMPLEJO IV.

A la vista de los resultados obtenidos con el silenciamiento de *Cox5b* *in vivo* e *in vitro*, nos planteamos si la sobreexpresión de esta subunidad podría tener el efecto opuesto y contrarrestar la expansión del WAT asociada a la edad. En primer lugar, quisimos ver si la sobreexpresión de COX5B *in vitro* en células HEK 293T era suficiente para modular la cantidad y actividad del complejo IV. Para ello, se transfectaron células HEK 293T con un vector pLVX-ZsGreen en el que previamente habíamos clonado el cDNA de *Cox5b* murino y, en paralelo, se transfectaron células control con vector vacío. La sobreexpresión de COX5B en HEK 293T fue suficiente para incrementar los niveles de proteína así como la actividad del complejo IV comprado con células control (Figura 23).

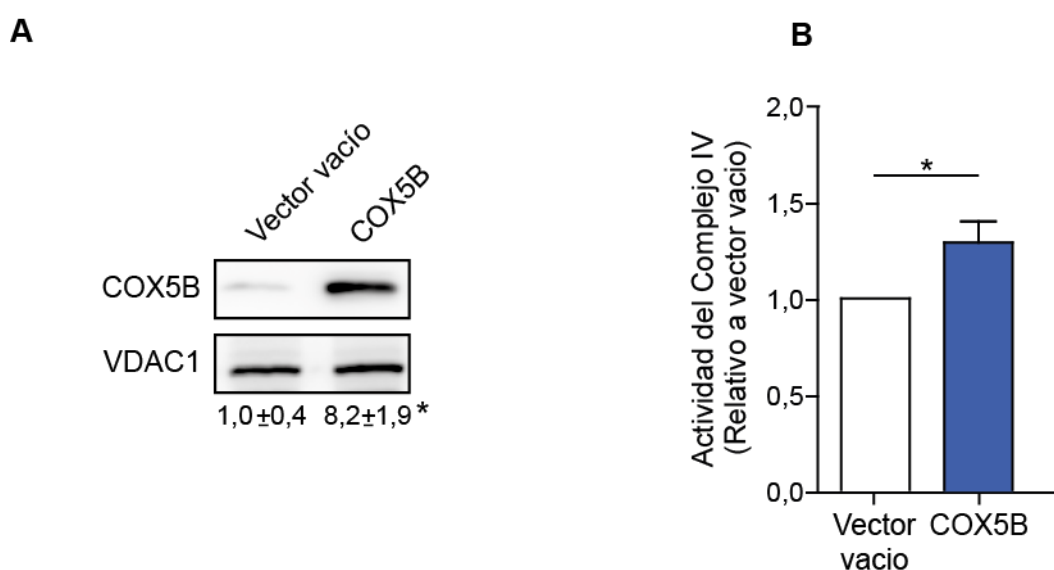


Figura 23. La sobreexpresión de COX5B es suficiente para aumentar la actividad del complejo IV *in vitro*.

(A) Western blot representativo y cuantificación (n=4 experimentos independientes) de los niveles de COX5B en células HEK 293T con el vector de expresión de COX5B o con el correspondiente vector vacío. La expresión de COX5B se normalizó respecto a la de VDAC1 y se relativizó respecto a los valores de las células control. (B) Actividad del complejo IV en células HEK 293T con el vector de expresión de COX5B o con el vector vacío (n=8 experimentos independientes). Los valores representan la media \pm error estándar. Para el análisis estadístico se aplicó T-Student (*, $p < 0,05$; ***, $p < 0,001$).

La inyección de partículas para sobreexpresar COX5B *in vivo* aumentó significativamente el cociente de expresión de ARNm de *Cox5b* entre eWAT inyectado/no-inyectado cuando se comparaba con los ratones inyectados con vector vacío (Figura 24B). Además, el cociente del tamaño medio de los adipocitos entre eWAT inyectado/no-inyectado era menor en los ratones inyectados con los virus de sobreexpresión de COX5B que aquellos inyectados con vector vacío (Figura 24C). En consecuencia, el análisis de distribución de frecuencias de tamaño de adipocitos reveló que en los acúmulos de eWAT inyectados con sobreexpresión de COX5B la proporción de adipocitos grandes estaba disminuida mientras que los adipocitos de menor tamaño vieron incrementada su proporción respecto al total de adipocitos cuando se comparan con los inyectados con vector vacío. Esto no ocurría en los depósitos que habían sido inyectados con el vector vacío (Figura 25A). Por el contrario, al comparar los lados no-inyectados de ambos ratones no se encontraron diferencias significativas en la distribución de frecuencias del tamaño de los adipocitos (Figura 25B)

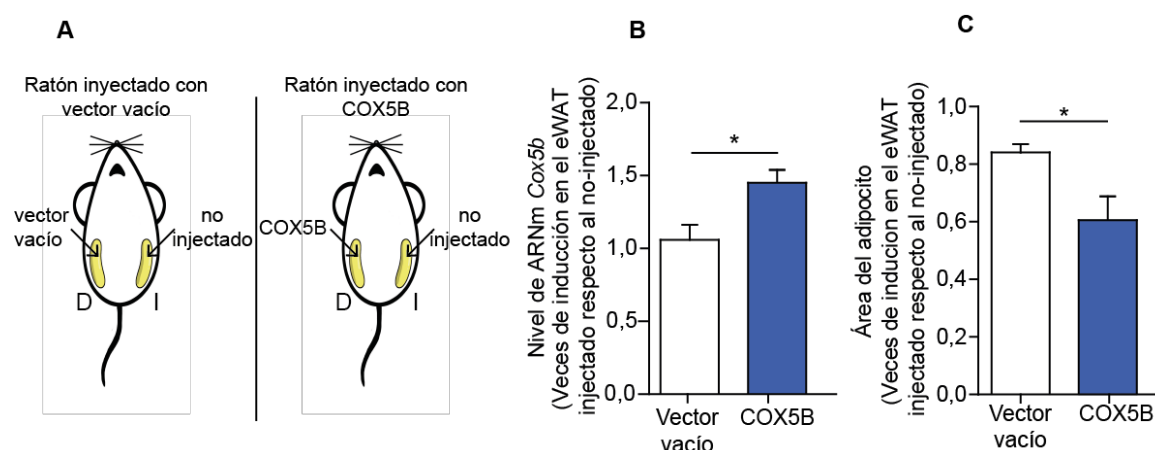


Figura 24. La sobreexpresión de COX5B *in vivo* disminuye el tamaño de los adipocitos en ratones envejecidos.

(A) Representación esquemática del protocolo seguido para la inyección de partículas lentivirales para la sobreexpresión de shCOX5B o con el vector vacío en ratones envejecidos. (B) Cociente de los niveles de expresión de ARNm de *Cox5b* de los eWAT inyectado frente al no inyectado con vector vacío (barra blanca; n=5) y con sobreexpresión de COX5B (barra azul; n=4). (C) Cociente del tamaño medio de los adipocitos en los eWAT inyectado frente al no inyectado con vector vacío (barra blanca; n=4) y con sobreexpresión de COX5B (barra azul; n=4). Los valores representan la media \pm error estándar. Para el análisis estadístico se aplicó T-Student (*, $p < 0,05$).

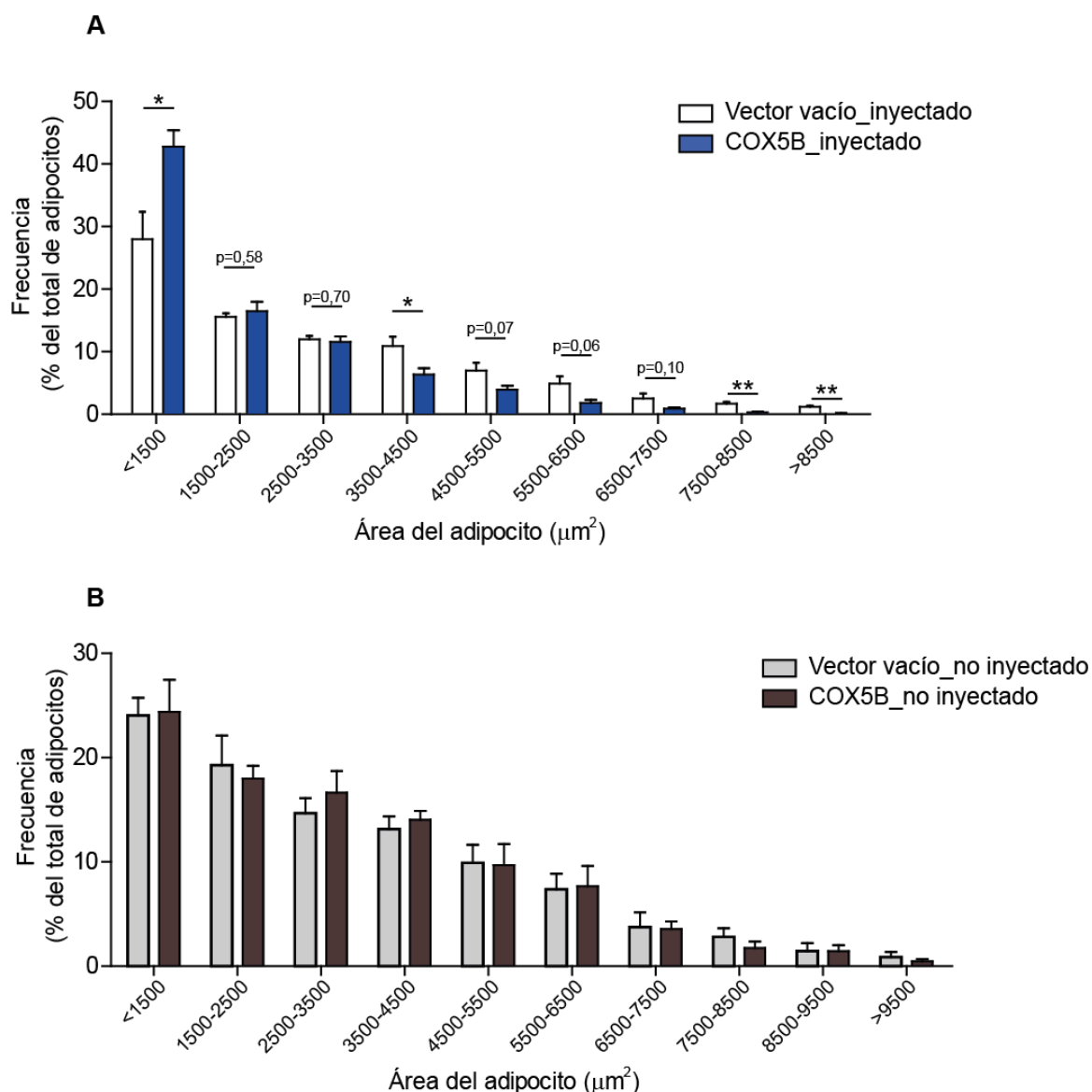


Figura 25. La sobreexpresión de COX5B *in vivo* contrarresta los efectos de la edad sobre el tamaño de los adipocitos.

(A) Distribución de frecuencias del tamaño de los adipocitos en eWAT inyectado del ratón con sobreexpresión COX5B (barras azul; n=4) y en el eWAT inyectado del ratón con vector vacío (barras blancas; n=4). (B) Distribución de frecuencias de tamaños del adipocito en eWAT no-inyectado del ratón inyectado con sobreexpresión de COX5B (barras marrones; n=4) y en el eWAT no-inyectado del ratón con vector vacío (barras grises; n=4). Los valores representan la media \pm error estándar. Para el análisis estadístico se aplicó T-Student (*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$).

En conjunto, estos resultados muestran que restaurar la expresión de COX5B en adipocitos *in vivo* es suficiente para revertir los efectos del envejecimiento en la expansión de los adipocitos y revelan el papel fundamental de esta subunidad del complejo IV en el control de la expansión del eWAT asociada a la edad.

4.5. COX5B COMO FACTOR PRONÓSTICO DE LA PÉRDIDA DE PESO EN PACIENTES OBESOS

Dada la relevancia de los niveles de COX5B en el WAT y en el control de peso en ratones, quisimos ver si también existía esta relación en humanos debido al gran potencial terapéutico que puede llegar a tener la modulación del complejo IV en la lucha contra la obesidad. Para ello, se midieron los niveles de expresión de ARNm en el tejido adiposo visceral humano (VAT) en pacientes de diferentes edades donde, al igual que en ratones, se vio que existe una correlación negativa entre la edad y la expresión génica de *COX5B* (Figura 26A). Ésta disminución en los niveles de *COX5B* se mantenía incluso después de normalizar los datos respecto al Índice de Masa Corporal (BMI) en un análisis de regresión múltiple (Figura 26B).

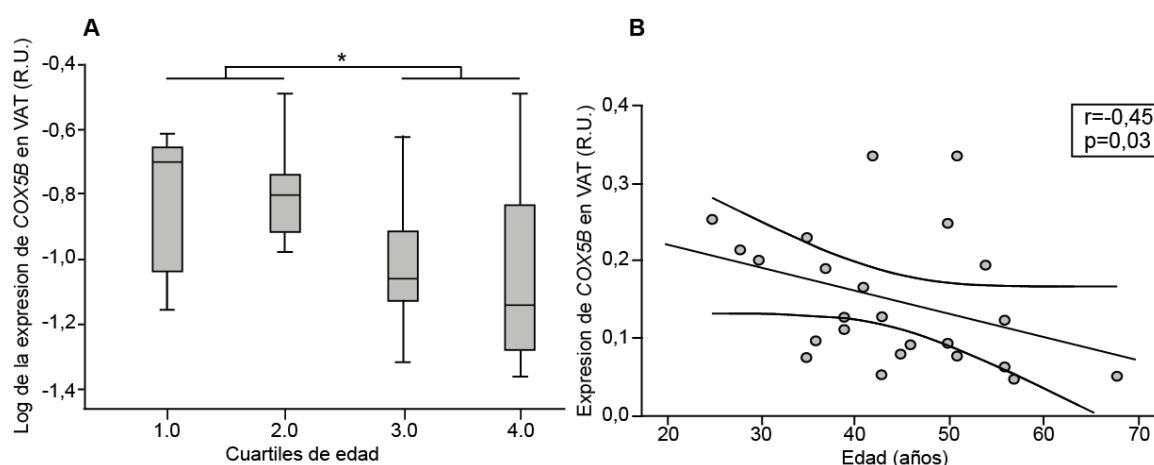


Figura 26. La expresión de *COX5B* en VAT disminuye con la edad en humanos.

(A) Diagramas de cajas que representan el Log de la expresión de *COX5B* frente a cuartiles de edad crecientes (cuartil 1: <36 años; cuartil 2: 36-43 años; cuartil 3: 43-51 años y cuartil 4: >51 años) (n=24). (B) Asociación lineal entre los niveles de expresión de *COX5B* en VAT frente a la edad. Los valores representan la media \pm error estándar. Las diferencias en la expresión génica entre los diferentes cuartiles de edad se evaluaron con un test tipo one way ANOVA (*, $p < 0,05$). Para la asociación lineal se empleó un test tipo Spearman's.

En paralelo, se analizaron los niveles de expresión de otro marcador mitocondrial, como es *VDAC1*, cuyos niveles no correlacionaban de manera significativa con la edad (Figura 27). Así, podemos concluir que la bajada en los niveles de ARNm de *COX5B* en VAT durante el envejecimiento no puede ser consecuencia de una disminución global del contenido mitocondrial, puesto que los niveles de *VDAC1* permanecen constantes y, por tanto, se puede decir que *COX5B* se reprime de manera específica también en el VAT en humanos.

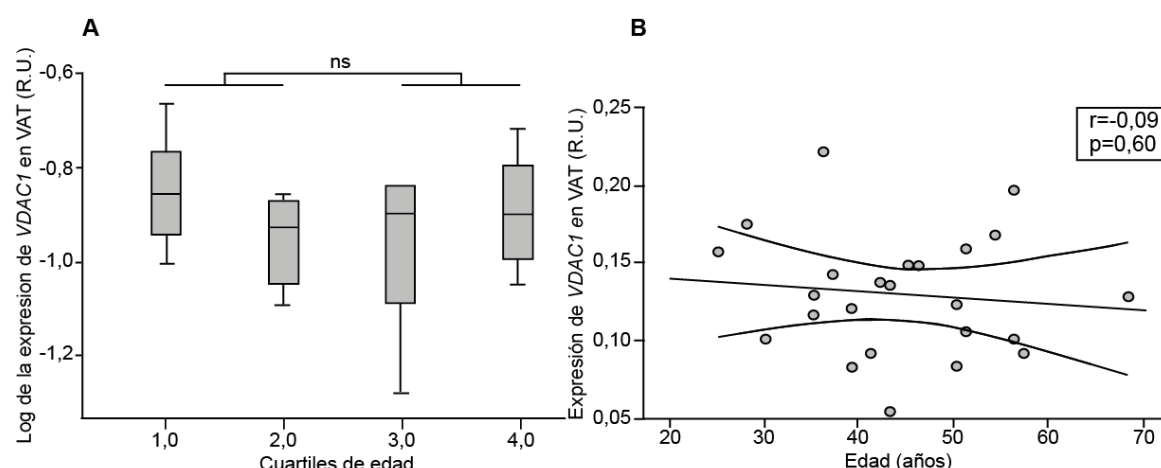


Figura 27. La expresión de VDAC1 en VAT no varía con la edad en humanos.

(A) Diagramas de cajas que representan el Log de la expresión de VDAC1 frente a cuartiles de edad crecientes (cuartil 1: <36 años; cuartil 2: 36-43 años; cuartil 3: 43-51 años y cuartil 4: >51 años) (n=24). (B) Asociación lineal entre los niveles de expresión de VDAC1 en VAT frente a la edad. Los valores representan la media \pm error estándar. Las diferencias en la expresión génica entre los diferentes cuartiles de edad se evaluaron con un test tipo one way ANOVA (ns significa diferencia no significativa). Para la asociación lineal se empleó un test tipo Spearman's.

Con el fin de profundizar en el valor clínico de la expresión de *COX5B* en el tejido adiposo blanco en pacientes obesos nos planteamos estudiar su valor pronóstico para la pérdida de peso tras la cirugía bariátrica. Desde que en 1954 se hizo la primera operación bariátrica, los métodos y técnicas quirúrgicas de este tipo han evolucionado en gran medida (Maggard et al., 2005). Aunque la cirugía bariátrica se ha convertido en una técnica ampliamente empleada que asegura una mayor pérdida de peso y más duradera en pacientes obesos que cualquier otro tratamiento (dieta, ejercicio, medicación, etc.) (Lutfi et al., 2006; Maggard et al., 2005), sigue existiendo una gran variabilidad en la respuesta a este tratamiento entre individuos, y el origen de estas diferencias y la forma de predecirlas se desconoce (Lutfi et al., 2006). En este sentido, quisimos estudiar si los niveles de *COX5B* en el tejido adiposo de pacientes obesos podrían servir como factor pronóstico en este tipo de intervenciones. Así, se midieron los niveles de *COX5B* en una cohorte de pacientes antes de la operación y se estudió la posible relación de los niveles de expresión de este gen con el BMI de los pacientes un año después de la operación. Puesto que la toma de muestras del VAT requiere una intervención clínica que implica anestesiarse y hospitalizar al paciente, consideramos oportuno realizar este estudio con muestras de tejido adiposo subcutáneo (SAT), ya que es un tejido mucho más accesible y se pueden tomar muestras de una forma poco invasiva (Campbell et al., 2009). Como se muestra en la Figura 28, los niveles de *COX5B* en el SAT correlacionan negativamente con el BMI de los pacientes un año después de la operación. Es decir, que aquellos pacientes con niveles altos de *COX5B*

presentaban un BMI menor un año después que aquellos cuyos niveles de *COX5B* eran inicialmente menores (Figura 28A). Esta asociación no se debe a variaciones generales en el contenido mitocondrial, puesto que no se observó ninguna correlación significativa cuando se analizaron los niveles de *VDAC1* en esta misma cohorte de pacientes (Figura 28B).

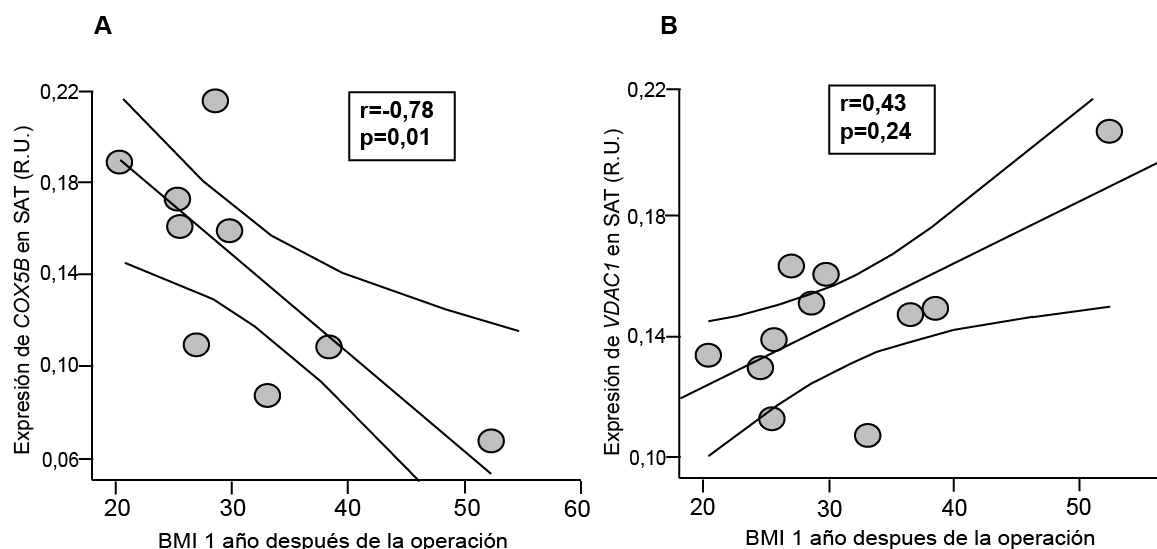


Figura 28. Valor pronóstico de *COX5B* en cirugía bariátrica.

Asociación lineal entre los niveles de expresión de (A) *COX5B* y (B) *VDAC1* en SAT frente al BMI un año después de la operación. Para la asociación lineal se empleó un test tipo Spearman's Rank ($n=9$).

En conjunto, todos los datos mostrados indican que existen algunos componentes mitocondriales (el complejo IV y concretamente *COX5B*) especialmente sensibles a la estabilización de HIF1A que tiene lugar durante la expansión WAT asociada a la edad y que favorecen la acumulación de lípidos en el interior de los adipocitos (y por tanto la expansión del mismo). Esta relación entre los niveles de expresión de *COX5B* y la expansión del WAT no solo tiene lugar en modelos animales, como el ratón, sino que también se ha demostrado esta relación en humanos, y se ha revelado el valor clínico de *COX5B* como marcador pronóstico en la pérdida de peso en pacientes que han sido sometidos a cirugía bariátrica.

5. DISCUSIÓN

En los últimos años, numerosos estudios han prestado especial atención a la biología del WAT ya que, además de su papel central como almacén del exceso de nutrientes en forma de TAGs, el WAT cumple una función endocrina mediante la secreción de factores solubles críticos para el mantenimiento de la homeostasis energética del organismo. En este sentido, dado que la mitocondria juega un papel esencial en ambos procesos (Kusminski and Scherer, 2012), se ha prestado especial atención a su papel en la biología del WAT y a la contribución de la disfunción mitocondrial en el desarrollo de obesidad y otras enfermedades metabólicas. Muchos de estos estudios se han realizado mediante el uso de modelos animales de obesidad extrema (como la administración de HFD o animales deficientes en la señalización de la leptina ya sean *ob/ob* o *db/db*) que no son equiparables al desarrollo de la obesidad en humanos (Bournat and Brown, 2010; Kusminski et al., 2012; Kusminski and Scherer, 2012; Shi et al., 2008; Vernochet et al., 2014; Vernochet et al., 2012; Villarroya et al., 2009; Wilson-Fritch et al., 2003); sin embargo apenas se han estudiado los cambios que tienen lugar en la mitocondria de los adipocitos durante la expansión del WAT asociada a la edad.

En este trabajo hemos identificado algunos componentes mitocondriales especialmente sensibles al envejecimiento de los adipocitos y hemos descrito que la función mitocondrial se ve alterada durante la expansión del WAT a la edad, pero no todos sus componentes se ven afectados en la misma medida. Concretamente, la cantidad y actividad de complejo IV se ven específicamente alteradas durante las primeras fases de la expansión de WAT, mientras que la expresión de marcadores de otros complejos mitocondriales y la cantidad de ADN mitocondrial no cambian. Proponemos también que, la represión de la subunidad COX5B es uno de los primeros eventos que tiene lugar durante el envejecimiento de los adipocitos. La represión inicial de esta subunidad, desencadenará la desestructuración del complejo IV y dará lugar a cambios en el metabolismo de los adipocitos blancos, que afectan a su capacidad oxidativa y, por consiguiente, se promueve la acumulación de lípidos y la expansión del WAT con la edad.

5.1. COMPARATIVA DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES DE OBESIDAD

La obesidad es una enfermedad cada vez más extendida, especialmente en las personas de mayor edad (Marcellini et al., 2009; Ng et al., 2014; Ogden et al., 2013; van Harmelen et al., 2003). Ello unido al aumento en la esperanza de vida permite establecer que cada vez será mayor el número de personas de avanzada edad

afectadas por esta enfermedad en el mundo. Además, numerosos estudios señalan que la obesidad agrava las dolencias/enfermedades asociadas a la edad (Kawachi, 1999; Khaodhiar et al., 1999; Lean et al., 1999; Sasaki, 2015; Thompson et al., 1999). Por tanto, es urgente conocer la base molecular de los cambios asociados a la ganancia de peso dependiente de la edad. Sin embargo, la mayoría de los trabajos en el campo de la obesidad se han llevado a cabo mediante el uso de modelos animales de obesidad inducida por dieta (HFD) o con ratones deficientes en la señalización de la leptina (*ob/ob* y *db/db*) los cuales no parecen reflejar un proceso de ganancia de peso natural por varios motivos:

(i) En primer lugar, la ganancia de peso inducida por dieta es un proceso mucho más rápido que la ganancia de peso asociada a la edad e implica una ingesta hipercalórica que no mimetiza las condiciones de ganancia de peso en humanos. Así, el peso de un ratón alimentado con HFD incrementa 2 gramos en los 2 primeros días y el tamaño de sus adipocitos casi duplica, mientras que estos cambios no son tan rápidos en ratones alimentados con una dieta con un contenido normal en grasa (Halberg et al., 2009).

(ii) En segundo lugar, como consecuencia de esta ganancia de peso tan acelerada, la expansión del WAT durante la administración de HFD es muy rápida y, a la vez, mucho más patológica (Halberg et al., 2009; Kihira et al., 2014), dando lugar a un WAT mucho más inflamado, fibrótico y disfuncional de lo que ocurre durante el envejecimiento. El incremento tan rápido en el tamaño de los adipocitos inducido por HDF ocasiona la aparición de focos hipóxicos (en principio más severos que los que puedan tener lugar durante la expansión asociada a la edad), que desencadenan la producción de proteínas de la matriz extracelular y, por último, necrosis de los adipocitos (Halberg et al., 2009; Sun et al., 2011). Como consecuencia, se reclutarán macrófagos al interior del tejido que secretarán citoquinas proinflamatorias (Weisberg et al., 2003; Xu et al., 2003) dando lugar a un WAT inflamado e induciendo fibrosis debido a la excesiva producción de proteínas de la matriz.

(iii) En tercer lugar, los animales sometidos a HFD, además de ser obesos, desarrollan otras enfermedades metabólicas probablemente como consecuencia, por una parte de la alteración en la secreción de adipocinas y citoquinas proinflamatorias asociadas a la expansión patológica del WAT (Rausch et al., 2008) y, por otra, del efecto provocado por el exceso en la ingesta de nutrientes (especialmente grasas) sobre el WAT y sobre otros tejidos. Un ejemplo claro es la acumulación ectópica de grasa (esteatosis cardiaca, esteatosis hepática) en animales alimentados con HFD, que es mucho más elevada que la que puede tener lugar durante la ganancia de peso asociada a la edad, dejando de

manifiesto que el impacto de la obesidad inducida por dieta en otros tejidos (además de en el WAT) también es más acusado.

(iv) Por último, la disminución general en el contenido y la actividad mitocondrial se considera una de las características asociadas a la obesidad (Choo et al., 2006; Rong et al., 2007; Sutherland et al., 2008; Valerio et al., 2006; Wilson-Fritch et al., 2004). Esta disfunción mitocondrial asociada a la obesidad inducida por dieta puede ser causada por el excesivo contenido en grasa de la dieta o la inflamación asociada, los cuales son escenarios que no tienen lugar (o se presumen mucho más disminuidos) durante la obesidad asociada a la edad (ver siguiente apartado). Nuestros datos en obesidad asociada a la edad no apoyan este punto ya que hemos demostrado que durante la expansión del WAT asociada a la edad no hay disminución de la cantidad de mitocondrias en los adipocitos, ni tampoco de la mayoría de los componentes de la ETC, a excepción del complejo IV.

En definitiva, consideramos que es necesario llevar a cabo estudios en modelos animales que mimeticen mejor la obesidad asociada a la edad, debido a que la remodelación del WAT inducida por dieta no puede ser comparada a la que tiene lugar durante el envejecimiento. Con el objetivo de estudiar la obesidad en un contexto más fisiológico, nos propusimos profundizar en la identificación de los cambios moleculares que tienen lugar en el WAT con la ganancia de peso asociada a la edad. Hemos identificado al complejo IV, y concretamente a la subunidad COX5B, como uno de los componentes especialmente sensibles a la expansión del WAT asociada a la edad, y cuya represión es dependiente de la estabilización del factor inducible por hipoxia HIF1A. Esta represión parece ser esencial para detener la oxidación de ácidos grasos en el adipocito blanco y promover la acumulación de lípidos. En este sentido, la sobreexpresión local de COX5B en el eWAT de ratones envejecidos alivia el aumento del tamaño de los adipocitos asociado a la edad, mientras que su silenciamiento, en el eWAT de ratones jóvenes, hace que los adipocitos aumenten de tamaño debido a la incapacidad para oxidar ácidos grasos. En conjunto, estos datos indican que el nivel de expresión de COX5B está directamente relacionado con el tamaño de los adipocitos puesto que es un factor determinante para la capacidad oxidativa de los mismos, haciendo que acumulen u oxiden los nutrientes de los que dispone.

5.2. DISFUNCIÓN MITOCONDRIAL EN MODELOS DE OBESIDAD

Son numerosos los estudios que han descrito una disminución generalizada de la actividad y el contenido mitocondrial en modelos animales de obesidad, ya sea empleando HFD o ratones deficientes en la señalización de la leptina (*ob/ob* o *db/db*) (Choo et al., 2006; Rong et al., 2007; Sutherland et al., 2008; Valerio et al., 2006; Wilson-Fritch et al., 2004), sin embargo en nuestro modelo de ganancia de peso asociada a la edad no observamos estas alteraciones. Aunque se desconoce la explicación a estas diferencias, una posibilidad es que la HFD sea excesivamente calórica y, como consecuencia, esté causando disfunción mitocondrial. De hecho, numerosos estudios han demostrado que niveles elevados de nutrientes (incluyendo glucosa y/o ácidos grasos) dan lugar a disfunción mitocondrial en los adipocitos (Gao et al., 2010; Kusminski and Scherer, 2012; Sutherland et al., 2008); por tanto, es razonable pensar que, en estos modelos de obesidad más exacerbados, la disfunción mitocondrial global sea una consecuencia de la sobrecarga de nutrientes (tras la administración de HFD los niveles en sangre de NEFA aumentan considerablemente) y no algo dependiente de la mera expansión del WAT. *Sutherland y colaboradores* señalan que durante la administración de HFD, la reducción del contenido mitocondrial en el WAT tiene lugar después del desarrollo de la resistencia a insulina, indicando que la disfunción mitocondrial no es causa sino consecuencia de la resistencia a insulina inducida por la dieta (Sutherland et al., 2008). Por otro lado, está ampliamente demostrado que los tratamientos con rosiglitazona (sensibilizador a insulina) en modelos de obesidad alivian la disfunción mitocondrial de los adipocitos (Choo et al., 2006; Rong et al., 2007; Sutherland et al., 2008; Wilson-Fritch et al., 2004). Sin embargo no hay una disminución de peso asociada al tratamiento, de modo que la disfunción mitocondrial puede que esté más asociada a la diabetes que a la propia expansión del WAT. Por otro lado, esta discordancia entre un aumento de la biogénesis mitocondrial sin disminución del peso, puede ser debida a que la rosiglitazona, además de activar PGCs (inductores de la biogénesis mitocondrial), también es un activador de PPAR γ (el principal regulador de la diferenciación de los adipocitos), que favorecerá la adipogénesis y, por tanto, la expansión del WAT. En este sentido, se ha descrito que tras el tratamiento con rosiglitazona, se produce una redistribución de la grasa en el organismo, de modo que, a pesar del aumento de peso, el peso relativo de la grasa visceral no aumenta sino que se acumula en otros depósitos (Akazawa et al., 2000; Nakamura et al., 2001; Wilson-Fritch et al., 2004) lo que contribuye también a la mejora de la resistencia a insulina.

En conjunto, todos estos datos indican que la disfunción mitocondrial global (p.e. bajada del contenido mitocondrial en adipocitos) no está asociada tan notoriamente a la expansión del WAT, sino que parece ser un efecto secundario de los modelos de obesidad que se han empleado hasta ahora basados en dietas hipercalóricas y/o ratones diabéticos, pero que no tiene lugar durante la expansión del WAT asociada a la edad.

Nuestras observaciones en ratones van en línea con los estudios realizados en humanos, donde la expansión del WAT es mucho más lenta que en los modelos animales de obesidad inducida por dieta (ver apartado anterior). Aunque algunos autores han demostrado que el contenido mitocondrial (medido como cantidad de mitADN) disminuye con la ganancia de peso asociada a la edad (Kaaman et al., 2007), otros estudios no han encontrado esta asociación (Dahlman et al., 2006; Kaaman et al., 2007; Lindinger et al., 2010; Yin et al., 2014). Concretamente, *Lindinger y colaboradores* demuestran que existe una disminución en el contenido mitocondrial en pacientes diabéticos, pero no tiene lugar en pacientes obesos no diabéticos (Lindinger et al., 2010). Por su parte, *Dahlman y colaboradores* también defienden esta hipótesis, ya que determinan que hay una disminución en la expresión de genes implicados en la OXPHOS en pacientes diabéticos independiente de la obesidad (Dahlman et al., 2006), de manera que estos genes no se reprimen en pacientes obesos, y sugieren que la disfunción de la OXPHOS en el VAT está directamente relacionada con la progresión de la diabetes. Nuestros datos en pacientes humanos muestran que la expresión de *VDAC1* (un marcador de contenido mitocondrial) no varía durante el envejecimiento en el VAT, mientras que hay una represión específica del marcador de complejo IV, *COX5B*, cuya expresión se reduce de manera significativa con la edad. Por tanto, es posible, que durante la ganancia de peso asociada a la edad, no se produzcan cambios en el contenido mitocondrial, sino que sea necesaria una situación mucho más patológica (como la resistencia a insulina o diabetes) para que tengan lugar cambios en el contenido mitocondrial de los adipocitos.

5.3. MODELOS GENÉTICOS DE MANIPULACIÓN DE COMPONENTES MITOCONDRIALES EN ADIPOCITOS *IN VIVO*

Con el objetivo de entender el papel de la mitocondria en la biología de los adipocitos blancos, en los últimos años, se han generado ratones deficientes en algunos componentes mitocondriales de manera específica en el WAT que han revelado el papel

esencial de una correcta función mitocondrial para el buen funcionamiento del WAT, y su importancia en el desarrollo de la obesidad y enfermedades metabólicas asociadas (Kusminski et al., 2012; Vernochet et al., 2014; Vernochet et al., 2012). Por ejemplo, *Kusminski y colaboradores* abordaron esta cuestión mediante la sobreexpresión y delección de mito-NEET en adipocitos, una proteína que se encuentra en la membrana mitocondrial interna y se encarga de mantener la homeostasis del hierro en la matriz mitocondrial. En ambos casos, la función mitocondrial se ve alterada afectando también al balance energético global de los ratones (Kusminski et al., 2012). Por una parte, la sobreexpresión de mito-NEET en los adipocitos da lugar a un desbalance en el transporte de hierro al interior de la mitocondria y, como consecuencia, tiene lugar una reducción del consumo de oxígeno mitocondrial así como de la beta-oxidación de ácidos grasos que, finalmente, promoverán una expansión exacerbada del WAT. Es importante señalar que se trata de una “expansión sana” del WAT que tiene lugar, principalmente, mediante un incremento en el número de adipocitos (hiperplasia), y no en el tamaño (hipertrofia), y va asociada a una mayor secreción de adiponectina, permitiendo una mejora en la sensibilidad a insulina de los ratones. La delección de mito-NEET produce el efecto opuesto, aumenta el consumo de oxígeno mitocondrial y la oxidación de ácidos grasos, haciendo que los ratones sean más delgados; sin embargo, la tolerancia a glucosa es menor, lo cual puede estar relacionado con el aumento en los niveles de ROS generados como consecuencia del aumento en la actividad mitocondrial (mayor consumo de oxígeno y mayor potencial de membrana). Esto demuestra la importancia de una buena función mitocondrial en el desarrollo de la diabetes independientemente del grado de expansión del WAT (Kusminski et al., 2012).

Estos estudios con los ratones deficientes en mito-NEET podrían llevar a pensar que la delección de genes que comprometan la actividad mitocondrial dará lugar de manera general a un aumento en el acumulo de grasa, ya que no podrán ser oxidados debidamente. Sin embargo, otros estudios en los que también se han delecionado genes mitocondriales específicamente en el WAT, han demostrado que no siempre es así (Vernochet et al., 2014; Vernochet et al., 2012). La delección en adipocitos del factor de transcripción A mitocondrial (TFAM) no da lugar a un incremento en el acúmulo de grasa, sino todo lo contrario (Vernochet et al., 2014; Vernochet et al., 2012). En un primer trabajo, *Vernochet y colaboradores* demostraron que la delección de TFAM en adipocitos (tanto blancos como marrones) da lugar a una disminución en el contenido mitocondrial (a nivel de DNA y de proteínas de la ETC), que se traduce en una caída en la actividad tanto del complejo I, como del complejo IV de la ETC. Sin embargo, la actividad del complejo II se ve incrementada en los adipocitos deficientes en TFAM,

posiblemente, como un efecto compensatorio a la disminución en la actividad del complejo I previamente señalada. Además, se produce un desacoplamiento de la respiración mitocondrial que, junto con el incremento en la actividad del complejo II, resulta en un mayor consumo de oxígeno mitocondrial y menor ganancia de peso en los ratones deficientes en TFAM (Vernochet et al., 2012). En un trabajo posterior de los mismos autores, utilizan un modelo deleción génica mucho más drástico que afecta a todos los depósitos de grasa del ratón y es capaz de reducir hasta en un 80% los niveles de expresión de TFAM en los adipocitos. La deleción tan severa de TFAM da lugar a una disminución en la expresión y en la actividad de los complejos I, III y IV de la ETC, lo que conlleva una disfunción mitocondrial global que causa la muerte de los adipocitos blancos e inflamación del tejido. Como consecuencia de esta lipodistrofia, los ratones deficientes en TFAM son resistentes a obesidad inducida por dieta (Vernochet et al., 2014). Nuestros datos revelan que algunos componentes mitocondriales (concretamente el complejo IV) son reprimidos en adipocitos blancos de manera natural con la edad pero, esta represión, no parecer dar lugar a mecanismos de compensación que hiperactiven la mitocondria (como en el caso de los ratones deficientes en TFAM), ya que la disminución en la cantidad y actividad del complejo IV es concomitante con un aumento en el tamaño de los adipocitos blancos y en el peso de los ratones. Por otro lado, la pérdida de COX5B asociada a la edad, y posterior reducción en la actividad mitocondrial, no es letal para los adipocitos como en el caso del segundo modelo de ratones deficientes para TFAM. Esto indica que la regulación de la actividad mitocondrial durante el envejecimiento no es tan drástica como en los modelos de ratones *knock-out*, pero sí suficiente para asegurar la acumulación de lípidos en el adipocito blanco. En este sentido, *Letellier y colaboradores* han demostrado que es necesario alcanzar un umbral de inactivación del complejo IV para causar efectos tan drásticos sobre la actividad y respiración mitocondrial (Letellier et al., 1994); de modo, que es posible, que durante la expansión del WAT asociada a la edad no se alcance este umbral permitiendo que los adipocitos sobrevivan, aunque con una menor actividad mitocondrial que promoverá un incremento en la acumulación de lípidos en los adipocitos.

5.4. ESTABILIZACIÓN DE HIF1A Y RESPUESTA A HIPOXIA EN EL WAT

Numerosos estudios han demostrado la aparición de focos hipóxicos en el WAT de ratones alimentados con dieta normal (Hosogai et al., 2007; Lee et al., 2014b; Ye et al., 2007) mediante la tinción con pimonidazol y que, tras la administración de HFD (o en

ratones ob/ob), ésta señal se ve incrementada (Hosogai et al., 2007; Lee et al., 2011; Lee et al., 2014b; Ye et al., 2007). Ésta hipoxia conlleva la estabilización de HIF1A, como se demuestra en este trabajo y en estudios anteriores (Krishnan et al., 2012; Lee et al., 2014b; Ye et al., 2007; Yin et al., 2009), cuyos niveles también incrementan con la expansión de WAT (Figura 9) (Krishnan et al., 2012; Lee et al., 2014b; Ye et al., 2007; Yin et al., 2009).

Todos estos datos van en línea con la hipótesis postulada por Trayhurn “The hypoxia hypothesis” (Trayhurn et al., 2008) que surge para explicar la inflamación del WAT asociada a la obesidad. Esta hipótesis postula que debido al incremento de tamaño de los adipocitos asociado a la expansión del WAT, el aporte de oxígeno se ve limitado debido a que la expansión del WAT no lleva asociado un aumento en la vascularización (Corvera and Gealekman, 2014; Sun et al., 2013b; Trayhurn, 2013; Voros et al., 2005) y a que el tamaño alcanzado por los adipocitos supera la distancia de difusión del oxígeno (Sun et al., 2013b; Trayhurn et al., 2008). Por otra parte, *Lee y colaboradores* han identificado otros mecanismos que pueden explicar la estabilización de HIF1A en el WAT tras la administración de HFD. En este trabajo se postula que la hipoxia local que se produce en el WAT es también debida a un desacoplamiento mitocondrial, inducido por el incremento en ácidos grasos circulantes que se produce tras la administración de HFD, lo que desencadenará: (i) un aumento del consumo de oxígeno en los adipocitos blancos que contribuye a la aparición de focos hipóxicos y, como consecuencia, (ii) la estabilización de HIF1A (Lee et al., 2014b). Al margen de estos mecanismos que desencadenan la aparición de focos hipóxicos en los animales alimentados con HFD, también se ha demostrado que puede haber hipoxia más moderada en el WAT durante su expansión asociada a la edad, (Krishnan et al., 2012; Lee et al., 2014b; Yin et al., 2009) lo cual está en línea con el aumento en la estabilización de HIF1A que hemos observado en ratones envejecidos (Figura 9).

Aunque todos estos mecanismos podrían dar explicación a la estabilización de HIF1A durante la ganancia de peso asociada a la edad, no se puede descartar la posibilidad de que existan otros mecanismos asociados al envejecimiento que pudieran estar participando en la estabilización de HIF1A (Gomes et al., 2013; Sasaki, 2015). En este sentido, *Gomes y colaboradores* han demostrado que HIF1A puede estabilizarse por la disminución en los niveles de NAD⁺ que tiene lugar durante el envejecimiento. Como consecuencia, disminuirá la actividad de SIRT1, que promoverá una reducción de los niveles de VHL y, por tanto, la estabilización de HIF1A (Gomes et al., 2013).

Por otra parte, estudios previos en modelos de obesidad inducida por dieta han demostrado que la estabilización de HIF1A es específica del WAT, puesto que no ha sido detectada en otros tejidos como músculo esquelético, hígado o BAT (Sun et al., 2013a). En el contexto de la expansión del WAT asociada a la edad, hemos constatado que HIF1A también se estabiliza específicamente en el WAT, ya que tampoco hemos detectado presencia de HIF1A en otros tejidos analizados de ratones envejecidos. Por último, es importante señalar que también se ha asociado la estabilización de HIF1A en el WAT con el desarrollo de la obesidad en humanos, de modo que los pacientes obesos se caracterizan por presentar mayores niveles de HIF1A en el VAT que aquellos que son delgados (Krishnan et al., 2012).

5.5. PAPEL DE HIF1A EN EL CONTROL DEL PESO

Son numerosos los trabajos que han estudiado la implicación de HIF1A en la progresión y mantenimiento de la obesidad (Halberg et al., 2009; Jiang et al., 2011; Kihira et al., 2014; Krishnan et al., 2012; Lee et al., 2011; Sun et al., 2013a). Los ratones deficientes para HIF1A son resistentes a obesidad inducida por dieta (Jiang et al., 2011; Krishnan et al., 2012; Sun et al., 2013a) y, además, la delección de HIF1A en ratones obesos, induce la pérdida de peso, revirtiendo el proceso inducido por la administración de HFD (Krishnan et al., 2012). En conjunto, estos datos ponen de manifiesto la importancia de la estabilización de HIF1A durante la expansión del WAT así como su relevancia en el control del peso en ratones obesos. En línea con estos estudios, en este trabajo se demuestra que HIF1A también está implicado en la ganancia de peso asociada a la edad, y que su estabilización tiene lugar durante las primeras fases de la expansión del WAT, sin necesidad de llegar a estados tan severos de obesidad como los inducidos por HFD. En cuanto a los mecanismos moleculares implicados en el proceso, existen varias hipótesis. Se ha demostrado que la pérdida de la señalización vía HIF1A en el WAT (ya sea por delección o inhibición de HIF1A o por delección de HIF1B) aumenta la sensibilidad a insulina por una estimulación de la secreción de adiponectina (Jiang et al., 2011) y reduce la captación de glucosa por parte de los adipocitos, debido a que se reprime la expresión de los transportadores de glucosa GLUT1 y GLUT4 y, como consecuencia, se inhibe la lipogénesis *de novo* (Lee et al., 2011). Por otra parte, se ha relacionado la estabilización de HIF1A en el WAT con la represión del catabolismo de ácidos grasos en los propios adipocitos blancos así como de la biogénesis mitocondrial dependiente de la activación de PGC1A mediada por la deacetilasa SIRT2 (Jiang et al., 2011; Krishnan et al., 2012) y, en algunos casos, se ha descrito que los adipocitos blancos deficientes en HIF1A adquieren ciertas características de adipocitos marrones (Krishnan et al., 2012).

Por último, la ganancia de HIF1A en el WAT se ha revelado, no sólo como un elemento esencial para la expansión del tejido adiposo, sino que también se ha asociado al remodelado patológico del WAT en condiciones de HFD. La estabilización crónica de HIF1A asociada a la rápida expansión del WAT induce la síntesis masiva de componentes de la matriz extracelular, dando lugar a un tejido fibrótico (Halberg et al., 2009). Como consecuencia de esta acumulación masiva de proteínas de la matriz extracelular, serán reclutadas células inflamatorias al interior del WAT, lo que dará como resultado fibrosis y disfunción del WAT (Sun et al., 2013b). Por el contrario, *Sun y colaboradores* describieron que la administración de un inhibidor de HIF1A a ratones alimentados con HFD, atenúa la fibrosis e inflamación asociadas a la obesidad inducida por dieta (Sun et al., 2013a). Todos estos cambios metabólicos asociados a la pérdida de HIF1A en el WAT, dan lugar a una disminución de la ganancia de peso inducida por dieta y una mejora en las enfermedades metabólicas asociadas a la obesidad (resistencia a insulina, esteatosis, secreción alterada de adipocinas, etc.).

Durante la expansión del WAT asociada a la edad no se observan algunos de los cambios dependientes de HIF1A previamente descritos en modelos de HFD, probablemente, porque los niveles de HIF1A que se alcanzan en condiciones basales son menores que los que se dan en un escenario más patológico y exacerbado como la obesidad inducida por dieta o en los ratones *ob/ob* (Ye et al., 2007; Yin et al., 2009). En este sentido, la estabilización de HIF1A asociada a la edad no es suficiente para dar lugar a variaciones en el contenido mitocondrial, ni tampoco en los niveles de expresión de *Adiponectina* o *Sirt2* (datos no mostrados). Sin embargo los niveles de expresión de COX5B (y algunas otras subunidades del complejo IV) si se ven afectados durante el envejecimiento sugiriendo que el complejo IV es especialmente sensible a la estabilización de HIF1A en este contexto. Además, el programa transcripcional inducido por HIF1A (incluso en condiciones de HFD), es parcialmente diferente al que se activa en otros contextos, de manera que aunque está ampliamente descrito que la estabilización de HIF1A en el WAT está íntimamente asociada a la inducción de GLUT1 en modelos de HFD (Halberg et al., 2009; Jiang et al., 2011; Sun et al., 2013a; Trayhurn et al., 2008), no es el caso de VEGF cuya inducción no tiene lugar en WAT de ratones sometidos a HFD (Halberg et al., 2009; Sun et al., 2013a). Estos datos ponen de manifiesto la necesidad de estudiar en mayor profundidad cual es el programa transcripcional ejecutado por HIF1A en el WAT, así como distinguir cuales son los genes regulados durante la expansión del WAT asociada a la edad de aquellos que se regulan en modelos de obesidad inducida por dieta.

5.6. PAPEL DE HIF1A SOBRE EL COMPLEJO IV

En relación con la represión de COX5B ejecutada por HIF1A, nuestros datos apuntan a que puede ser encuadrada en la capacidad de HIF1A para reprimir algunos genes dependientes de c-MYC (entre los que se encuentra COX5B) (Morrish et al., 2003). Generalmente la actividad transcripcional de HIF1A conlleva la inducción de los genes diana, sin embargo en los últimos años se han identificado numerosos genes reprimidos por HIF1A, ya sea por su unión directa al promotor de los genes diana (Gao et al., 2013; Krishnan et al., 2012; Narravula and Colgan, 2001; Xi et al., 2014), o ya sea de manera indirecta por desplazamiento de c-MYC del promotor (Gordan et al., 2007). Aunque tanto HIF1A como c-MYC favorecen la glucólisis y comparten numerosas dianas de transcripción en esta ruta, ambos factores de transcripción tienen efectos opuestos sobre la biogénesis mitocondrial (Gordan et al., 2007). Está ampliamente descrito que c-MYC promueve la biogénesis y actividad mitocondrial para asegurar la biosíntesis de macromoléculas necesaria para la proliferación celular (Coller et al., 2000; Li et al., 2005; O'Connell et al., 2003; Wu et al., 1999), mientras que HIF1A se caracteriza por ser un represor de la actividad mitocondrial con el objetivo de disminuir la producción de ROS en condiciones de hipoxia (Fukuda et al., 2007; Kim et al., 2006; Papandreou et al., 2006).

Por otra parte, *Dhar y colaboradores* describieron que todas las subunidades del complejo IV codificadas por el genoma nuclear tienen un sitio funcional de unión a NRF1, el cual está implicado en promover el incremento coordinado de la transcripción de los componentes del complejo IV codificados en el núcleo (Dhar et al., 2008). La secuencia de ADN consenso que reconoce NRF1 contiene un dominio central con secuencia CA(T/C)GCG, que es idéntico al sitio de unión de los dímeros MYC:MAX (Grandori and Eisenman, 1997; Morrish et al., 2003; Virbasius et al., 1993). En este trabajo hemos identificado que únicamente el sitio de unión a NRF1 del promotor de *Cox5b* contiene un sitio MYC:MAX, que permite la unión de c-MYC al promotor proximal de dicha subunidad del complejo IV. En condiciones de hipoxia, la unión de c-MYC al promotor se pierde, probablemente de manera dependiente de HIF1A. Por tanto, como se indicaba al principio de este apartado, creemos que la especial sensibilidad de COX5B a la estabilización de HIF1A se debe a la presencia de dicho sitio de unión de c-MYC, frente a otras proteínas del complejo IV que carecen de este sitio solapante NRF1/c-MYC, cuya regulación puede producirse por otros mecanismos que no impliquen directamente a HIF1A.

Esta sensibilidad especial de COX5B a la hipoxia ha sido también descrita previamente por *Prabu y colaboradores* en sistemas *in vitro* e implicando la modificación a nivel postraducciona de esta subunidad. En su trabajo muestran que las subunidades mt-CO1, COX4i y COX5B son especialmente sensibles a la fosforilación mediada por PKA que tiene lugar en hipoxia. Además, en línea con nuestros resultados en adipocitos, como consecuencia de la fosforilación de estas tres subunidades (mt-CO1, COX4i y COX5B), la actividad catalítica del complejo IV se ve disminuida, dando lugar a una bajada en la producción de ROS (Prabu et al., 2006). Por tanto, COX5B podría ser un elemento especialmente sensible a las fluctuaciones de oxígeno que impactan tanto controlando su expresión génica (como se demuestra en este trabajo), así como a nivel de modificaciones postraduccionales (Prabu et al., 2006).

Nuestros datos también apuntan a que, aunque todas las subunidades son necesarias, COX5B es especialmente relevante para la formación y actividad del complejo IV. En este sentido, *Galati y colaboradores* describieron que el silenciamiento de COX5B da lugar a una disminución en el ensamblaje y actividad del complejo IV en macrófagos, así como a una despolarización de la membrana mitocondrial y un incremento en la producción de ROS (Galati et al., 2009). Nuestros datos también demuestran la relevancia de esta subunidad en adipocitos, tanto para el ensamblaje y actividad del complejo IV, como para la función mitocondrial en el adipocito blanco. De esta manera, la disminución en la actividad del complejo IV, secundaria a la pérdida de COX5B, promueve la acumulación de lípidos y da lugar a un aumento en el tamaño de los adipocitos. Es posible que el incremento en la producción de ROS descrito por *Galati y colaboradores* también tenga lugar en los adipocitos blancos durante la ganancia de peso asociada a la edad. Así, si la expansión del WAT se prolonga en el tiempo, esta exposición prolongada a ROS dé lugar a la disfunción mitocondrial que se ha asociado a situaciones de obesidad más severa y promueva una mayor estabilización de HIF1A agravando aún más la situación.

Por último, es importante señalar que no descartamos la posibilidad de que el silenciamiento de otra de las subunidades del complejo IV pueda dar lugar a efectos similares. De hecho, durante la expansión WAT asociada a la edad también disminuye la expresión de otras subunidades del complejo IV (Figura 8), lo que puede contribuir al incremento en la acumulación de lípidos. Sin embargo, hay que tener en cuenta que (i) la represión de *Cox5b* es un evento primario en respuesta a la estabilización de HIF1A asociada a la edad y (ii) silenciado únicamente *Cox5b* se ven comprometidos el ensamblaje del complejo IV y la estabilidad del resto de subunidades del mismo. Por

tanto, proponemos que la represión inicial de *Cox5b* puede promover, por sí sola, la pérdida de expresión del resto de subunidades y, como consecuencia de ello, se desencadene una sucesión de cambios que darán lugar a la pérdida del complejo IV y al incremento en la acumulación de lípidos.

5.7. POTENCIAL TERAPEUTICO DE COX5B EN PACIENTES OBESOS

Nuestros datos muestran que el restablecimiento de los niveles de expresión de COX5B en adipocitos de ratones envejecidos revierte la expansión del WAT asociada a la edad y anticipa su posible uso terapéutico. Por otra parte, hemos demostrado que los niveles de COX5B en tejido adiposo pueden tener un valor clínico adicional como factor pronóstico en tratamientos para la obesidad. Aunque la cirugía bariátrica se ha convertido en la mejor alternativa terapéutica para los pacientes obesos (Lutfi et al., 2006; Maggard et al., 2005), la variabilidad en la respuesta a este tratamiento entre individuos sigue siendo un problema clínico, y la posibilidad de predecir la respuesta al tratamiento sigue siendo una difícil de anticipar (Lutfi et al., 2006). En este trabajo proponemos que el nivel de expresión de *COX5B* en la grasa subcutánea puede emplearse como marcador pronóstico para este tipo de tratamientos, ya que hemos demostrado que existe una correlación positiva entre los niveles de expresión de *COX5B*, en pacientes obesos antes de la operación, y capacidad para perder peso durante el año siguiente a la intervención. Este hecho convierte a COX5B en un indicador de la capacidad de los pacientes para perder peso tras ser sometidos a la cirugía bariátrica.

Aunque la disminución en la expresión de *COX5B* con la edad se ha analizado en muestras de tejido adiposo visceral, tanto en humanos como en ratones, es posible que en el tejido adiposo subcutáneo también tenga lugar esta represión selectiva del complejo IV durante el envejecimiento. El motivo principal por el que se han utilizado muestras de tejido adiposo subcutáneo, en lugar de visceral, está basada en que es un tejido mucho más accesible, que permite tomar la muestra sin tener que anestesiarse ni ingresar al paciente, lo que supondría una reducción en los riesgos para el paciente y permite una notable disminución en los costes de la intervención.

5.8. **CONCLUSIONES FINALES**

En resumen, en este trabajo se ha identificado al complejo IV, y concretamente a COX5B, como un componente mitocondrial especialmente vulnerable al envejecimiento y a la expansión del WAT en ratones y humanos. Se ha establecido una relación directa entre la pérdida de COX5B (ya sea asociada al envejecimiento o mediante ARN de interferencia) con una disminución de la actividad del complejo IV y una mayor acumulación de lípidos, debido a que éstos no pueden ser oxidados. Se ha propuesto un mecanismo molecular para esta regulación en el que están implicados los factores de transcripción HIF1A y c-MYC. Este mecanismo implica que HIF1A desplaza a c-MYC de la región promotora de *Cox5b*, haciendo que los niveles de expresión de esta subunidad del complejo IV disminuyan en el WAT de ratones envejecidos. La pérdida en la expresión de COX5B promoverá una disminución en la actividad y ensamblaje del complejo IV, que puede dar lugar a una disminución global en la cantidad del resto de subunidades de este complejo. Por último, los efectos asociados a la pérdida de COX5B durante la expansión del WAT son reversibles, puesto que restaurando la expresión de esta proteína en los adipocitos de ratones envejecidos hemos conseguido revertir la hipertrofia asociada a la edad (Figura 29)

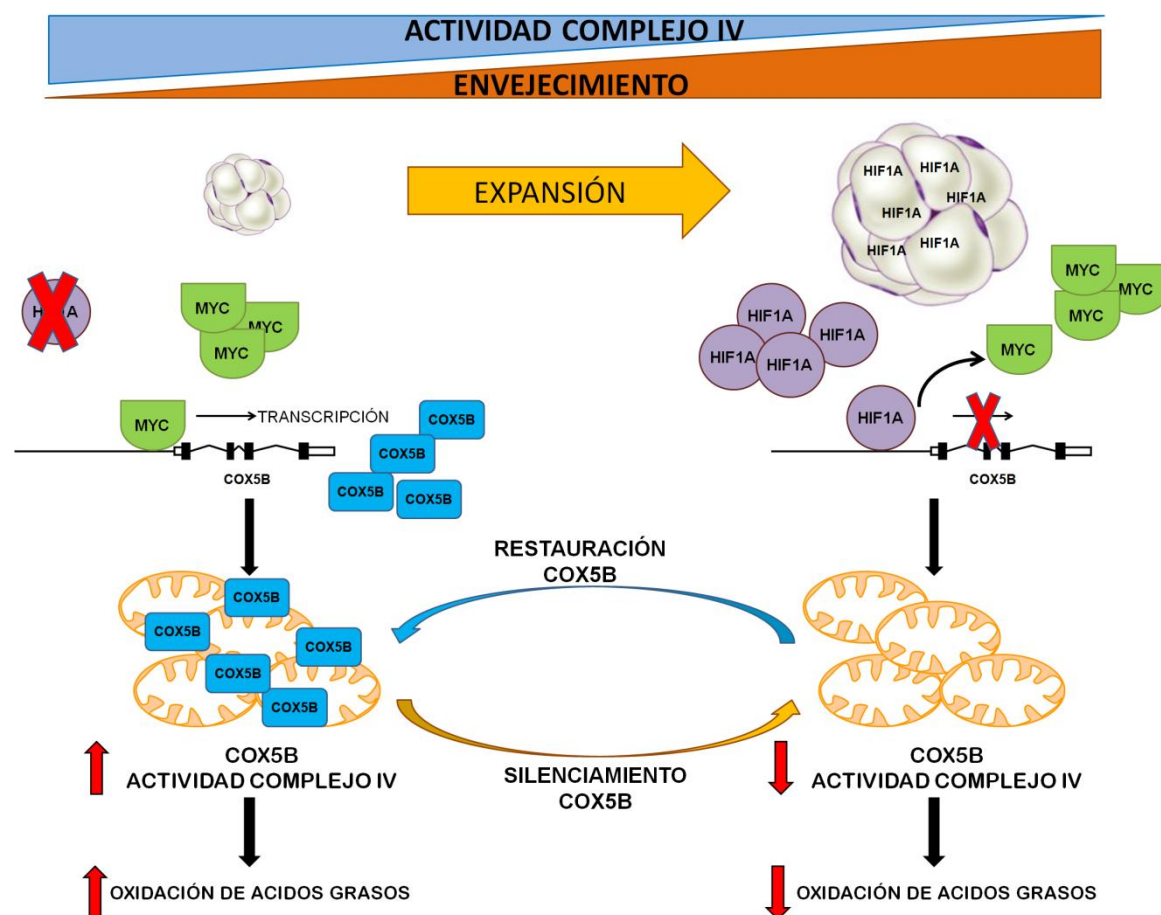


Figura 29. Papel del complejo IV en la expansión del WAT asociada a la edad.

Durante la expansión del WAT asociada a la edad tendrá lugar la estabilización de HIF1A, quien reprimirá la expresión de *Cox5b* mediante el desplazamiento de c-MYC de su región promotora. La pérdida en la expresión de *Cox5b* promoverá una disminución en la actividad y ensamblaje del complejo IV, que puede dar lugar a una disminución global en la cantidad del resto de subunidades de este complejo. Como consecuencia de ello, disminuirá la oxidación de ácidos grasos promoviendo la acumulación de lípidos en el interior de los adipocitos y, por tanto, la expansión del WAT. Esta reprogramación mitocondrial asociada al envejecimiento puede ser revertida mediante la inducción de la expresión de COX5B de manera exógena.

6. CONCLUSIONES

1. La expresión y actividad del complejo IV de la cadena de transporte electrónico disminuyen en adipocitos blancos aislados durante la ganancia de peso asociada a la edad de manera específica, ya que la expresión de otros marcadores mitocondriales no se ve alterada.
2. Concretamente, las subunidades del complejo IV, *Cox5b*, *Cox8a*, *Cox6a1* y *Cox6c* son especialmente sensibles al envejecimiento en el WAT, de modo que su nivel de expresión disminuye en el WAT de ratones envejecidos mientras que la expresión del resto de subunidades se mantiene sin cambios significativos.
3. Durante la expansión del WAT asociada a la edad se estabiliza HIF1A en los adipocitos, siendo HIF1A esencial para promover la ganancia de peso asociada a la edad.
4. Los niveles de HIF1A alcanzados en este contexto, son suficientes para disminuir la actividad de complejo IV y la expresión de algunas de sus subunidades sensibles al envejecimiento. Únicamente la represión de *Cox5b* y *Cox8a* es dependiente de HIF1A en el WAT de ratones envejecidos.
5. La represión de *Cox5b* dependiente de HIF1A asociada a la edad, involucra la pérdida de unión de c-MYC a su promotor en condiciones de hipoxia. Este mecanismo de regulación es específico de *Cox5b*, ya que el resto de subunidades del complejo IV no presentan este sitio de unión consenso para c-MYC en su región promotora.
6. El silenciamiento de *Cox5b in vitro* es suficiente para reducir la actividad y ensamblaje del complejo IV, así como estabilidad de otras subunidades de dicho complejo.
7. El silenciamiento de *Cox5b in vitro*, así como la inactivación farmacológica del complejo IV, promueven una mayor acumulación de lípidos concomitante con una reducción en la capacidad para oxidar ácidos grasos en células 3T3-L1.
8. El silenciamiento de *Cox5b in vivo* en ratones jóvenes, da lugar a un aumento en el tamaño de los adipocitos; mientras que la recuperación de los niveles de COX5B *in vivo* en ratones envejecidos, es suficiente para revertir el incremento en el tamaño de los adipocitos dependiente de la edad.
9. La represión de COX5B durante el envejecimiento también tiene lugar en el tejido adiposo blanco humano. Además, los niveles de expresión de COX5B en

el tejido adiposo subcutáneo pueden servir como marcador pronóstico para predecir la pérdida de peso en pacientes obesos tras someterse a cirugía bariátrica.

7. BIBLIOGRAFÍA

Acin-Perez, R., and Enriquez, J.A. (2014). The function of the respiratory supercomplexes: the plasticity model. *Biochim Biophys Acta* 1837, 444-450.

Akazawa, S., Sun, F., Ito, M., Kawasaki, E., and Eguchi, K. (2000). Efficacy of troglitazone on body fat distribution in type 2 diabetes. *Diabetes Care* 23, 1067-1071.

Albuquerque, F.N., Somers, V.K., Blume, G., Miranda, W., Korenfeld, Y., Calvin, A.D., Qin, R., and Lopez-Jimenez, F. (2012). Usefulness of epicardial adipose tissue as predictor of cardiovascular events in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 110, 1100-1105.

Aragones, J., Fraisl, P., Baes, M., and Carmeliet, P. (2009). Oxygen sensors at the crossroad of metabolism. *Cell Metab* 9, 11-22.

Aragones, J., Schneider, M., Van Geyte, K., Fraisl, P., Dresselaers, T., Mazzone, M., Dirx, R., Zacchigna, S., Lemieux, H., Jeoung, N.H., *et al.* (2008). Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism. *Nat Genet* 40, 170-180.

Asterholm, I.W., and Scherer, P.E. (2010). Enhanced metabolic flexibility associated with elevated adiponectin levels. *Am J Pathol* 176, 1364-1376.

Balsa, E., Marco, R., Perales-Clemente, E., Szklarczyk, R., Calvo, E., Landazuri, M.O., and Enriquez, J.A. (2012). NDUFA4 is a subunit of complex IV of the mammalian electron transport chain. *Cell Metab* 16, 378-386.

Bergers, G., and Benjamin, L.E. (2003). Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer* 3, 401-410.

Bluher, M., Michael, M.D., Peroni, O.D., Ueki, K., Carter, N., Kahn, B.B., and Kahn, C.R. (2002). Adipose tissue selective insulin receptor knockout protects against obesity and obesity-related glucose intolerance. *Dev Cell* 3, 25-38.

Bogacka, I., Ukropcova, B., McNeil, M., Gimble, J.M., and Smith, S.R. (2005). Structural and functional consequences of mitochondrial biogenesis in human adipocytes in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 90, 6650-6656.

Borghjod, S., and Feinman, R.D. (2012). Response of C57Bl/6 mice to a carbohydrate-free diet. *Nutr Metab (Lond)* 9, 69.

Boucher, J., Mori, M.A., Lee, K.Y., Smyth, G., Liew, C.W., Macotela, Y., Rourk, M., Bluher, M., Russell, S.J., and Kahn, C.R. (2012). Impaired thermogenesis and adipose tissue development in mice with fat-specific disruption of insulin and IGF-1 signalling. *Nat Commun* 3, 902.

Bournat, J.C., and Brown, C.W. (2010). Mitochondrial dysfunction in obesity. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 17, 446-452.

Braun, R.D., Lanzen, J.L., Snyder, S.A., and Dewhirst, M.W. (2001). Comparison of tumor and normal tissue oxygen tension measurements using OxyLite or microelectrodes in rodents. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280, H2533-2544.

Calzada, M.J., and del Peso, L. (2007). Hypoxia-inducible factors and cancer. *Clin Transl Oncol* 9, 278-289.

Campbell, K.L., Makar, K.W., Kratz, M., Foster-Schubert, K.E., McTiernan, A., and Ulrich, C.M. (2009). A pilot study of sampling subcutaneous adipose tissue to examine biomarkers of cancer risk. *Cancer Prev Res (Phila)* 2, 37-42.

Campfield, L.A., Smith, F.J., Guisez, Y., Devos, R., and Burn, P. (1995). Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. *Science* 269, 546-549.

Cavalier-Smith, T. (1987). Eukaryotes with no mitochondria. *Nature* 326, 332-333.

Cinti, S., Mitchell, G., Barbatelli, G., Murano, I., Ceresi, E., Faloia, E., Wang, S., Fortier, M., Greenberg, A.S., and Obin, M.S. (2005). Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. *J Lipid Res* 46, 2347-2355.

Clayton, D.A. (1982). Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 28, 693-705.

Cohen, P., Levy, J.D., Zhang, Y., Frontini, A., Kolodin, D.P., Svensson, K.J., Lo, J.C., Zeng, X., Ye, L., Khandekar, M.J., *et al.* (2014). Ablation of PRDM16 and beige adipose causes metabolic dysfunction and a subcutaneous to visceral fat switch. *Cell* 156, 304-316.

Coller, H.A., Grandori, C., Tamayo, P., Colbert, T., Lander, E.S., Eisenman, R.N., and Golub, T.R. (2000). Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that

MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 3260-3265.

Corvera, S., and Gealekman, O. (2014). Adipose tissue angiogenesis: impact on obesity and type-2 diabetes. *Biochim Biophys Acta* 1842, 463-472.

Choo, H.J., Kim, J.H., Kwon, O.B., Lee, C.S., Mun, J.Y., Han, S.S., Yoon, Y.S., Yoon, G., Choi, K.M., and Ko, Y.G. (2006). Mitochondria are impaired in the adipocytes of type 2 diabetic mice. *Diabetologia* 49, 784-791.

Chow, D.C., Wenning, L.A., Miller, W.M., and Papoutsakis, E.T. (2001). Modeling pO(2) distributions in the bone marrow hematopoietic compartment. I. Krogh's model. *Biophys J* 81, 675-684.

Dahia, P.L., Ross, K.N., Wright, M.E., Hayashida, C.Y., Santagata, S., Barontini, M., Kung, A.L., Sanso, G., Powers, J.F., Tischler, A.S., *et al.* (2005). A HIF1alpha regulatory loop links hypoxia and mitochondrial signals in pheochromocytomas. *PLoS Genet* 1, 72-80.

Dahlman, I., Forsgren, M., Sjogren, A., Nordstrom, E.A., Kaaman, M., Naslund, E., Attersand, A., and Arner, P. (2006). Downregulation of electron transport chain genes in visceral adipose tissue in type 2 diabetes independent of obesity and possibly involving tumor necrosis factor-alpha. *Diabetes* 55, 1792-1799.

Dhar, S.S., Ongwijitwat, S., and Wong-Riley, M.T. (2008). Nuclear respiratory factor 1 regulates all ten nuclear-encoded subunits of cytochrome c oxidase in neurons. *J Biol Chem* 283, 3120-3129.

Donohoe, C.L., Doyle, S.L., and Reynolds, J.V. (2011). Visceral adiposity, insulin resistance and cancer risk. *Diabetol Metab Syndr* 3, 12.

Erecinska, M., and Silver, I.A. (2001). Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia. *Respir Physiol* 128, 263-276.

Erlor, J.T., Cawthorne, C.J., Williams, K.J., Koritzinsky, M., Wouters, B.G., Wilson, C., Miller, C., Demonacos, C., Stratford, I.J., and Dive, C. (2004). Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance. *Mol Cell Biol* 24, 2875-2889.

Firth, J.D., Ebert, B.L., Pugh, C.W., and Ratcliffe, P.J. (1994). Oxygen-regulated control elements in the phosphoglycerate kinase 1 and lactate dehydrogenase A genes: similarities with the erythropoietin 3' enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 6496-6500.

Fukuda, R., Zhang, H., Kim, J.W., Shimoda, L., Dang, C.V., and Semenza, G.L. (2007). HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell* *129*, 111-122.

Galarraga, M., Campion, J., Munoz-Barrutia, A., Boque, N., Moreno, H., Martinez, J.A., Milagro, F., and Ortiz-de-Solorzano, C. (2012). Adiposoft: automated software for the analysis of white adipose tissue cellularity in histological sections. *J Lipid Res* *53*, 2791-2796.

Galati, D., Srinivasan, S., Raza, H., Prabu, S.K., Hardy, M., Chandran, K., Lopez, M., Kalyanaraman, B., and Avadhani, N.G. (2009). Role of nuclear-encoded subunit Vb in the assembly and stability of cytochrome c oxidase complex: implications in mitochondrial dysfunction and ROS production. *Biochem J* *420*, 439-449.

Gao, C.L., Zhu, C., Zhao, Y.P., Chen, X.H., Ji, C.B., Zhang, C.M., Zhu, J.G., Xia, Z.K., Tong, M.L., and Guo, X.R. (2010). Mitochondrial dysfunction is induced by high levels of glucose and free fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Endocrinol* *320*, 25-33.

Gao, Y.H., Li, C.X., Shen, S.M., Li, H., Chen, G.Q., Wei, Q., and Wang, L.S. (2013). Hypoxia-inducible factor 1alpha mediates the down-regulation of superoxide dismutase 2 in von Hippel-Lindau deficient renal clear cell carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* *435*, 46-51.

Gesta, S., Tseng, Y.H., and Kahn, C.R. (2007). Developmental origin of fat: tracking obesity to its source. *Cell* *131*, 242-256.

Gomes, A.P., Price, N.L., Ling, A.J., Moslehi, J.J., Montgomery, M.K., Rajman, L., White, J.P., Teodoro, J.S., Wrann, C.D., Hubbard, B.P., *et al.* (2013). Declining NAD(+) induces a pseudohypoxic state disrupting nuclear-mitochondrial communication during aging. *Cell* *155*, 1624-1638.

Gordan, J.D., Thompson, C.B., and Simon, M.C. (2007). HIF and c-Myc: sibling rivals for control of cancer cell metabolism and proliferation. *Cancer Cell* *12*, 108-113.

Grandori, C., and Eisenman, R.N. (1997). Myc target genes. *Trends Biochem Sci* *22*, 177-181.

Guo, J., Jou, W., Gavrilova, O., and Hall, K.D. (2009). Persistent diet-induced obesity in male C57BL/6 mice resulting from temporary obesogenic diets. *PLoS One* 4, e5370.

Halberg, N., Khan, T., Trujillo, M.E., Wernstedt-Asterholm, I., Attie, A.D., Sherwani, S., Wang, Z.V., Landskroner-Eiger, S., Dineen, S., Magalang, U.J., *et al.* (2009). Hypoxia-inducible factor 1 α induces fibrosis and insulin resistance in white adipose tissue. *Mol Cell Biol* 29, 4467-4483.

He, W., Barak, Y., Hevener, A., Olson, P., Liao, D., Le, J., Nelson, M., Ong, E., Olefsky, J.M., and Evans, R.M. (2003). Adipose-specific peroxisome proliferator-activated receptor gamma knockout causes insulin resistance in fat and liver but not in muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 15712-15717.

Helmlinger, G., Yuan, F., Dellian, M., and Jain, R.K. (1997). Interstitial pH and pO₂ gradients in solid tumors in vivo: high-resolution measurements reveal a lack of correlation. *Nat Med* 3, 177-182.

Hoppeler, H., and Fluck, M. (2003). Plasticity of skeletal muscle mitochondria: structure and function. *Med Sci Sports Exerc* 35, 95-104.

Hosogai, N., Fukuhara, A., Oshima, K., Miyata, Y., Tanaka, S., Segawa, K., Furukawa, S., Tochino, Y., Komuro, R., Matsuda, M., and Shimomura, I. (2007). Adipose tissue hypoxia in obesity and its impact on adipocytokine dysregulation. *Diabetes* 56, 901-911.

Hotamisligil, G.S., Shargill, N.S., and Spiegelman, B.M. (1993). Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* 259, 87-91.

Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S., and Kaelin, W.G., Jr. (2001). HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 292, 464-468.

Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., von Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., *et al.* (2001). Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292, 468-472.

Jiang, B.H., Rue, E., Wang, G.L., Roe, R., and Semenza, G.L. (1996). Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271, 17771-17778.

Jiang, C., Qu, A., Matsubara, T., Chanturiya, T., Jou, W., Gavrilova, O., Shah, Y.M., and Gonzalez, F.J. (2011). Disruption of hypoxia-inducible factor 1 in adipocytes improves insulin sensitivity and decreases adiposity in high-fat diet-fed mice. *Diabetes* 60, 2484-2495.

Jones, J.R., Barrick, C., Kim, K.A., Lindner, J., Blondeau, B., Fujimoto, Y., Shiota, M., Kesterson, R.A., Kahn, B.B., and Magnuson, M.A. (2005). Deletion of PPARgamma in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 6207-6212.

Kaaman, M., Sparks, L.M., van Harmelen, V., Smith, S.R., Sjolin, E., Dahlman, I., and Arner, P. (2007). Strong association between mitochondrial DNA copy number and lipogenesis in human white adipose tissue. *Diabetologia* 50, 2526-2533.

Karastergiou, K., and Fried, S.K. (2013). Multiple adipose depots increase cardiovascular risk via local and systemic effects. *Curr Atheroscler Rep* 15, 361.

Kawachi, I. (1999). Physical and psychological consequences of weight gain. *J Clin Psychiatry* 60 Suppl 21, 5-9.

Kern, P.A., Di Gregorio, G.B., Lu, T., Rassouli, N., and Ranganathan, G. (2003). Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression. *Diabetes* 52, 1779-1785.

Khaodhiar, L., McCowen, K.C., and Blackburn, G.L. (1999). Obesity and its comorbid conditions. *Clin Cornerstone* 2, 17-31.

Kihira, Y., Miyake, M., Hirata, M., Hoshina, Y., Kato, K., Shirakawa, H., Sakaue, H., Yamano, N., Izawa-Ishizawa, Y., Ishizawa, K., *et al.* (2014). Deletion of hypoxia-inducible factor-1alpha in adipocytes enhances glucagon-like peptide-1 secretion and reduces adipose tissue inflammation. *PLoS One* 9, e93856.

Kim, J.W., Tchernyshyov, I., Semenza, G.L., and Dang, C.V. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab* 3, 177-185.

Koh, E.H., Kim, M., Ranjan, K.C., Kim, H.S., Park, H.S., Oh, K.S., Park, I.S., Lee, W.J., Kim, M.S., Park, J.Y., *et al.* (2010). eNOS plays a major role in adiponectin synthesis in adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298, E846-853.

Koh, E.H., Park, J.Y., Park, H.S., Jeon, M.J., Ryu, J.W., Kim, M., Kim, S.Y., Kim, M.S., Kim, S.W., Park, I.S., *et al.* (2007). Essential role of mitochondrial function in adiponectin synthesis in adipocytes. *Diabetes* 56, 2973-2981.

Kopecky, J., Rossmeisl, M., Flachs, P., Brauner, P., Sponarova, J., Matejkova, O., Prazak, T., Ruzickova, J., Bardova, K., and Kuda, O. (2004). Energy metabolism of adipose tissue--physiological aspects and target in obesity treatment. *Physiol Res* 53 Suppl 1, S225-232.

Krishnan, J., Danzer, C., Simka, T., Ukropec, J., Walter, K.M., Kumpf, S., Mirtschink, P., Ukropcova, B., Gasperikova, D., Pedrazzini, T., and Krek, W. (2012). Dietary obesity-associated Hif1alpha activation in adipocytes restricts fatty acid oxidation and energy expenditure via suppression of the Sirt2-NAD⁺ system. *Genes Dev* 26, 259-270.

Krotkiewski, M., Bjorntorp, P., Sjostrom, L., and Smith, U. (1983). Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *J Clin Invest* 72, 1150-1162.

Kusminski, C.M., Holland, W.L., Sun, K., Park, J., Spurgin, S.B., Lin, Y., Askew, G.R., Simcox, J.A., McClain, D.A., Li, C., and Scherer, P.E. (2012). MitoNEET-driven alterations in adipocyte mitochondrial activity reveal a crucial adaptive process that preserves insulin sensitivity in obesity. *Nat Med* 18, 1539-1549.

Kusminski, C.M., and Scherer, P.E. (2009). The road from discovery to clinic: adiponectin as a biomarker of metabolic status. *Clin Pharmacol Ther* 86, 592-595.

Kusminski, C.M., and Scherer, P.E. (2012). Mitochondrial dysfunction in white adipose tissue. *Trends Endocrinol Metab* 23, 435-443.

Lapiente-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acin-Perez, R., Latorre-Pellicer, A., Colas, C., Balsa, E., Perales-Clemente, E., Quiros, P.M., Calvo, E., Rodriguez-Hernandez, M.A., *et al.* (2013). Supercomplex assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain. *Science* 340, 1567-1570.

Lean, M.E., Han, T.S., and Seidell, J.C. (1999). Impairment of health and quality of life using new US federal guidelines for the identification of obesity. *Arch Intern Med* 159, 837-843.

Lee, J.S., Kim, K.J., Kim, Y.H., Kim, D.B., Shin, G.H., Cho, J.H., Kim, B.K., Lee, B.Y., and Lee, O.H. (2014a). Codonopsis lanceolata extract prevents diet-induced obesity in C57BL/6 mice. *Nutrients* 6, 4663-4677.

Lee, K.Y., Gesta, S., Boucher, J., Wang, X.L., and Kahn, C.R. (2011). The differential role of Hif1beta/Arnt and the hypoxic response in adipose function, fibrosis, and inflammation. *Cell Metab* 14, 491-503.

Lee, M.J., Wu, Y., and Fried, S.K. (2013). Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Mol Aspects Med* 34, 1-11.

Lee, Y.S., Kim, J.W., Osborne, O., Oh da, Y., Sasik, R., Schenk, S., Chen, A., Chung, H., Murphy, A., Watkins, S.M., *et al.* (2014b). Increased adipocyte O₂ consumption triggers HIF-1alpha, causing inflammation and insulin resistance in obesity. *Cell* 157, 1339-1352.

Leichtweiss, H.P., Lubbers, D.W., Weiss, C., Baumgartl, H., and Reschke, W. (1969). The oxygen supply of the rat kidney: measurements of intrarenal pO₂. *Pflugers Arch* 309, 328-349.

Letellier, T., Heinrich, R., Malgat, M., and Mazat, J.P. (1994). The kinetic basis of threshold effects observed in mitochondrial diseases: a systemic approach. *Biochem J* 302 (Pt 1), 171-174.

Li, F., Wang, Y., Zeller, K.I., Potter, J.J., Wonsey, D.R., O'Donnell, K.A., Kim, J.W., Yustein, J.T., Lee, L.A., and Dang, C.V. (2005). Myc stimulates nuclearly encoded mitochondrial genes and mitochondrial biogenesis. *Mol Cell Biol* 25, 6225-6234.

Lindinger, A., Peterli, R., Peters, T., Kern, B., von Flue, M., Calame, M., Hoch, M., Eberle, A.N., and Lindinger, P.W. (2010). Mitochondrial DNA content in human omental adipose tissue. *Obes Surg* 20, 84-92.

Lolmede, K., Durand de Saint Front, V., Galitzky, J., Lafontan, M., and Bouloumie, A. (2003). Effects of hypoxia on the expression of proangiogenic factors in differentiated 3T3-F442A adipocytes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27, 1187-1195.

Lopez-Otin, C., Blasco, M.A., Partridge, L., Serrano, M., and Kroemer, G. (2013). The hallmarks of aging. *Cell* 153, 1194-1217.

Lumeng, C.N., Deyoung, S.M., Bodzin, J.L., and Saltiel, A.R. (2007). Increased inflammatory properties of adipose tissue macrophages recruited during diet-induced obesity. *Diabetes* 56, 16-23.

Lutfi, R., Torquati, A., Sekhar, N., and Richards, W.O. (2006). Predictors of success after laparoscopic gastric bypass: a multivariate analysis of socioeconomic factors. *Surg Endosc* 20, 864-867.

Mack, F.A., Patel, J.H., Biju, M.P., Haase, V.H., and Simon, M.C. (2005). Decreased growth of Vhl-/- fibrosarcomas is associated with elevated levels of cyclin kinase inhibitors p21 and p27. *Mol Cell Biol* 25, 4565-4578.

Maggard, M.A., Shugarman, L.R., Suttorp, M., Maglione, M., Sugerman, H.J., Livingston, E.H., Nguyen, N.T., Li, Z., Mojica, W.A., Hilton, L., *et al.* (2005). Meta-analysis: surgical treatment of obesity. *Ann Intern Med* 142, 547-559.

Majmundar, A.J., Wong, W.J., and Simon, M.C. (2010). Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. *Mol Cell* 40, 294-309.

Marcellini, F., Giuli, C., Papa, R., Tirabassi, G., Faloia, E., Boscaro, M., Polito, A., Ciarapica, D., Zaccaria, M., and Mocchegiani, E. (2009). Obesity and body mass index (BMI) in relation to life-style and psycho-social aspects. *Arch Gerontol Geriatr* 49 Suppl 1, 195-206.

Mendoza-Nunez, V.M., Garcia-Sanchez, A., Sanchez-Rodriguez, M., Galvan-Duarte, R.E., and Fonseca-Yerena, M.E. (2002). Overweight, waist circumference, age, gender, and insulin resistance as risk factors for hyperleptinemia. *Obes Res* 10, 253-259.

Miro-Murillo, M., Elorza, A., Soro-Arnaiz, I., Albacete-Albacete, L., Ordonez, A., Balsa, E., Vara-Vega, A., Vazquez, S., Fuertes, E., Fernandez-Criado, C., *et al.* (2011). Acute Vhl gene inactivation induces cardiac HIF-dependent erythropoietin gene expression. *PLoS One* 6, e22589.

Morrish, F., Giedt, C., and Hockenbery, D. (2003). c-MYC apoptotic function is mediated by NRF-1 target genes. *Genes Dev* 17, 240-255.

Nakamura, T., Funahashi, T., Yamashita, S., Nishida, M., Nishida, Y., Takahashi, M., Hotta, K., Kuriyama, H., Kihara, S., Ohuchi, N., *et al.* (2001). Thiazolidinedione derivative improves fat distribution and multiple risk factors in subjects with visceral fat

accumulation--double-blind placebo-controlled trial. *Diabetes Res Clin Pract* 54, 181-190.

Nakanishi, R., Rajani, R., Cheng, V.Y., Gransar, H., Nakazato, R., Shmilovich, H., Otaki, Y., Hayes, S.W., Thomson, L.E., Friedman, J.D., *et al.* (2011). Increase in epicardial fat volume is associated with greater coronary artery calcification progression in subjects at intermediate risk by coronary calcium score: a serial study using non-contrast cardiac CT. *Atherosclerosis* 218, 363-368.

Narravula, S., and Colgan, S.P. (2001). Hypoxia-inducible factor 1-mediated inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor alpha expression during hypoxia. *J Immunol* 166, 7543-7548.

Nawrocki, A.R., Rajala, M.W., Tomas, E., Pajvani, U.B., Saha, A.K., Trumbauer, M.E., Pang, Z., Chen, A.S., Ruderman, N.B., Chen, H., *et al.* (2006). Mice lacking adiponectin show decreased hepatic insulin sensitivity and reduced responsiveness to peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists. *J Biol Chem* 281, 2654-2660.

Ng, M., Fleming, T., Robinson, M., Thomson, B., Graetz, N., Margono, C., Mullany, E.C., Biryukov, S., Abbafati, C., Abera, S.F., *et al.* (2014). Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* 384, 766-781.

Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Hosoya, Y., Yamashita, H., Fujita, H., Ohsugi, M., Tobe, K., Kadowaki, T., Nagai, R., and Sugiura, S. (2007). Adipogenesis in obesity requires close interplay between differentiating adipocytes, stromal cells, and blood vessels. *Diabetes* 56, 1517-1526.

Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Seo, K., Yamashita, H., Hosoya, Y., Ohsugi, M., Tobe, K., Kadowaki, T., Nagai, R., and Sugiura, S. (2008). In vivo imaging in mice reveals local cell dynamics and inflammation in obese adipose tissue. *J Clin Invest* 118, 710-721.

Nunnari, J., and Suomalainen, A. (2012). Mitochondria: in sickness and in health. *Cell* 148, 1145-1159.

O'Connell, B.C., Cheung, A.F., Simkevich, C.P., Tam, W., Ren, X., Mateyak, M.K., and Sedivy, J.M. (2003). A large scale genetic analysis of c-Myc-regulated gene expression patterns. *J Biol Chem* 278, 12563-12573.

Ogden, C.L., Carroll, M.D., Kit, B.K., and Flegal, K.M. (2013). Prevalence of obesity among adults: United States, 2011-2012. *NCHS Data Brief*, 1-8.

Oswal, A., and Yeo, G. (2010). Leptin and the control of body weight: a review of its diverse central targets, signaling mechanisms, and role in the pathogenesis of obesity. *Obesity (Silver Spring)* 18, 221-229.

Papandreou, I., Cairns, R.A., Fontana, L., Lim, A.L., and Denko, N.C. (2006). HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab* 3, 187-197.

Pasarica, M., Sereda, O.R., Redman, L.M., Albarado, D.C., Hymel, D.T., Roan, L.E., Rood, J.C., Burk, D.H., and Smith, S.R. (2009). Reduced adipose tissue oxygenation in human obesity: evidence for rarefaction, macrophage chemotaxis, and inflammation without an angiogenic response. *Diabetes* 58, 718-725.

Prabu, S.K., Anandatheerthavarada, H.K., Raza, H., Srinivasan, S., Spear, J.F., and Avadhani, N.G. (2006). Protein kinase A-mediated phosphorylation modulates cytochrome c oxidase function and augments hypoxia and myocardial ischemia-related injury. *J Biol Chem* 281, 2061-2070.

Proenca, A.R., Sertie, R.A., Oliveira, A.C., Campana, A.B., Caminhotto, R.O., Chimin, P., and Lima, F.B. (2014). New concepts in white adipose tissue physiology. *Braz J Med Biol Res* 47, 192-205.

Rausch, M.E., Weisberg, S., Vardhana, P., and Tortoriello, D.V. (2008). Obesity in C57BL/6J mice is characterized by adipose tissue hypoxia and cytotoxic T-cell infiltration. *Int J Obes (Lond)* 32, 451-463.

Rolfe, D.F., and Brown, G.C. (1997). Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev* 77, 731-758.

Rong, J.X., Qiu, Y., Hansen, M.K., Zhu, L., Zhang, V., Xie, M., Okamoto, Y., Mattie, M.D., Higashiyama, H., Asano, S., *et al.* (2007). Adipose mitochondrial biogenesis is suppressed in db/db and high-fat diet-fed mice and improved by rosiglitazone. *Diabetes* 56, 1751-1760.

Rosen, E.D., and Spiegelman, B.M. (2006). Adipocytes as regulators of energy balance and glucose homeostasis. *Nature* 444, 847-853.

Rosen, E.D., and Spiegelman, B.M. (2014). What we talk about when we talk about fat. *Cell* 156, 20-44.

Ryan, H.E., Poloni, M., McNulty, W., Elson, D., Gassmann, M., Arbeit, J.M., and Johnson, R.S. (2000). Hypoxia-inducible factor-1 α is a positive factor in solid tumor growth. *Cancer Res* 60, 4010-4015.

Sackmann-Sala, L., Berryman, D.E., Munn, R.D., Lubbers, E.R., and Kopchick, J.J. (2012). Heterogeneity among white adipose tissue depots in male C57BL/6J mice. *Obesity (Silver Spring)* 20, 101-111.

Sasaki, T. (2015). Age-Associated Weight Gain, Leptin, and SIRT1: A Possible Role for Hypothalamic SIRT1 in the Prevention of Weight Gain and Aging through Modulation of Leptin Sensitivity. *Front Endocrinol (Lausanne)* 6, 109.

Sassmann, A., Offermanns, S., and Wettschureck, N. (2010). Tamoxifen-inducible Cre-mediated recombination in adipocytes. *Genesis* 48, 618-625.

Schagger, H. (1995). Native electrophoresis for isolation of mitochondrial oxidative phosphorylation protein complexes. *Methods Enzymol* 260, 190-202.

Scherer, P.E. (2006). Adipose tissue: from lipid storage compartment to endocrine organ. *Diabetes* 55, 1537-1545.

Semenza, G.L. (2003a). Angiogenesis in ischemic and neoplastic disorders. *Annu Rev Med* 54, 17-28.

Semenza, G.L. (2003b). Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 3, 721-732.

Shi, X., Burkart, A., Nicoloso, S.M., Czech, M.P., Straubhaar, J., and Corvera, S. (2008). Paradoxical effect of mitochondrial respiratory chain impairment on insulin signaling and glucose transport in adipose cells. *J Biol Chem* 283, 30658-30667.

Shimoda, L.A., Fallon, M., Pisarcik, S., Wang, J., and Semenza, G.L. (2006). HIF-1 regulates hypoxic induction of NHE1 expression and alkalinization of intracellular pH in pulmonary arterial myocytes. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 291, L941-949.

Singer, D., and Muhlfeld, C. (2007). Perinatal adaptation in mammals: the impact of metabolic rate. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 148, 780-784.

Spiegelman, B.M., and Flier, J.S. (2001). Obesity and the regulation of energy balance. *Cell* 104, 531-543.

Sridharan, V., Guichard, J., Li, C.Y., Muise-Helmericks, R., Beeson, C.C., and Wright, G.L. (2008). O(2)-sensing signal cascade: clamping of O(2) respiration, reduced ATP utilization, and inducible fumarate respiration. *Am J Physiol Cell Physiol* 295, C29-37.

Strissel, K.J., Stancheva, Z., Miyoshi, H., Perfield, J.W., 2nd, DeFuria, J., Jick, Z., Greenberg, A.S., and Obin, M.S. (2007). Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications. *Diabetes* 56, 2910-2918.

Sun, K., Halberg, N., Khan, M., Magalang, U.J., and Scherer, P.E. (2013a). Selective inhibition of hypoxia-inducible factor 1alpha ameliorates adipose tissue dysfunction. *Mol Cell Biol* 33, 904-917.

Sun, K., Kusminski, C.M., and Scherer, P.E. (2011). Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest* 121, 2094-2101.

Sun, K., Tordjman, J., Clement, K., and Scherer, P.E. (2013b). Fibrosis and adipose tissue dysfunction. *Cell Metab* 18, 470-477.

Sutherland, L.N., Capozzi, L.C., Turchinsky, N.J., Bell, R.C., and Wright, D.C. (2008). Time course of high-fat diet-induced reductions in adipose tissue mitochondrial proteins: potential mechanisms and the relationship to glucose intolerance. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 295, E1076-1083.

Taylor, C.T. (2008). Mitochondria and cellular oxygen sensing in the HIF pathway. *Biochem J* 409, 19-26.

Tello, D., Balsa, E., Acosta-Iborra, B., Fuertes-Yebra, E., Elorza, A., Ordonez, A., Corral-Escariz, M., Soro, I., Lopez-Bernardo, E., Perales-Clemente, E., *et al.* (2011). Induction of the mitochondrial NDUFA4L2 protein by HIF-1alpha decreases oxygen consumption by inhibiting Complex I activity. *Cell Metab* 14, 768-779.

Thompson, D., Edelsberg, J., Colditz, G.A., Bird, A.P., and Oster, G. (1999). Lifetime health and economic consequences of obesity. *Arch Intern Med* 159, 2177-2183.

Tormos, K.V., Anso, E., Hamanaka, R.B., Eisenbart, J., Joseph, J., Kalyanaraman, B., and Chandel, N.S. (2011). Mitochondrial complex III ROS regulate adipocyte differentiation. *Cell Metab* 14, 537-544.

Trayhurn, P. (2013). Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity. *Physiol Rev* 93, 1-21.

Trayhurn, P., Wang, B., and Wood, I.S. (2008). Hypoxia in adipose tissue: a basis for the dysregulation of tissue function in obesity? *Br J Nutr* 100, 227-235.

Trayhurn, P., and Wood, I.S. (2004). Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 92, 347-355.

Ullah, M.S., Davies, A.J., and Halestrap, A.P. (2006). The plasma membrane lactate transporter MCT4, but not MCT1, is up-regulated by hypoxia through a HIF-1alpha-dependent mechanism. *J Biol Chem* 281, 9030-9037.

Valerio, A., Cardile, A., Cozzi, V., Bracale, R., Tedesco, L., Pisconti, A., Palomba, L., Cantoni, O., Clementi, E., Moncada, S., *et al.* (2006). TNF-alpha downregulates eNOS expression and mitochondrial biogenesis in fat and muscle of obese rodents. *J Clin Invest* 116, 2791-2798.

van Harmelen, V., Skurk, T., Rohrig, K., Lee, Y.M., Halbleib, M., Aprath-Husmann, I., and Hauner, H. (2003). Effect of BMI and age on adipose tissue cellularity and differentiation capacity in women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 27, 889-895.

Vernochet, C., Damilano, F., Mourier, A., Bezy, O., Mori, M.A., Smyth, G., Rosenzweig, A., Larsson, N.G., and Kahn, C.R. (2014). Adipose tissue mitochondrial dysfunction triggers a lipodystrophic syndrome with insulin resistance, hepatosteatosis, and cardiovascular complications. *FASEB J* 28, 4408-4419.

Vernochet, C., Mourier, A., Bezy, O., Macotela, Y., Boucher, J., Rardin, M.J., An, D., Lee, K.Y., Ilkayeva, O.R., Zingaretti, C.M., *et al.* (2012). Adipose-specific deletion of TFAM increases mitochondrial oxidation and protects mice against obesity and insulin resistance. *Cell Metab* 16, 765-776.

Villarroya, J., Giralt, M., and Villarroya, F. (2009). Mitochondrial DNA: an up-and-coming actor in white adipose tissue pathophysiology. *Obesity (Silver Spring)* 17, 1814-1820.

Virbasius, C.A., Virbasius, J.V., and Scarpulla, R.C. (1993). NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, utilizes a new DNA-binding domain conserved in a family of developmental regulators. *Genes Dev* 7, 2431-2445.

Vitali, A., Murano, I., Zingaretti, M.C., Frontini, A., Ricquier, D., and Cinti, S. (2012). The adipose organ of obesity-prone C57BL/6J mice is composed of mixed white and brown adipocytes. *J Lipid Res* 53, 619-629.

Voros, G., Maquoi, E., Demeulemeester, D., Clerx, N., Collen, D., and Lijnen, H.R. (2005). Modulation of angiogenesis during adipose tissue development in murine models of obesity. *Endocrinology* 146, 4545-4554.

Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., and Semenza, G.L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 5510-5514.

Ward, J.P. (2008). Oxygen sensors in context. *Biochim Biophys Acta* 1777, 1-14.

Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112, 1796-1808.

Wilson-Fritch, L., Burkart, A., Bell, G., Mendelson, K., Leszyk, J., Nicoloso, S., Czech, M., and Corvera, S. (2003). Mitochondrial biogenesis and remodeling during adipogenesis and in response to the insulin sensitizer rosiglitazone. *Mol Cell Biol* 23, 1085-1094.

Wilson-Fritch, L., Nicoloso, S., Chouinard, M., Lazar, M.A., Chui, P.C., Leszyk, J., Straubhaar, J., Czech, M.P., and Corvera, S. (2004). Mitochondrial remodeling in adipose tissue associated with obesity and treatment with rosiglitazone. *J Clin Invest* 114, 1281-1289.

Wolf, M.J., Adili, A., Piotrowitz, K., Abdullah, Z., Boege, Y., Stemmer, K., Ringelhan, M., Simonavicius, N., Egger, M., Wohlleber, D., *et al.* (2014). Metabolic activation of intrahepatic CD8⁺ T cells and NKT cells causes nonalcoholic steatohepatitis and liver cancer via cross-talk with hepatocytes. *Cancer Cell* 26, 549-564.

Wong, R.H., and Sul, H.S. (2010). Insulin signaling in fatty acid and fat synthesis: a transcriptional perspective. *Curr Opin Pharmacol* 10, 684-691.

Wood, I.S., Wang, B., Lorente-Cebrian, S., and Trayhurn, P. (2007). Hypoxia increases expression of selective facilitative glucose transporters (GLUT) and 2-deoxy-D-glucose uptake in human adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 361, 468-473.

Wu, J., Cohen, P., and Spiegelman, B.M. (2013). Adaptive thermogenesis in adipocytes: is beige the new brown? *Genes Dev* 27, 234-250.

Wu, K.J., Polack, A., and Dalla-Favera, R. (1999). Coordinated regulation of iron-controlling genes, H-ferritin and IRP2, by c-MYC. *Science* 283, 676-679.

Xi, H., Gao, Y.H., Han, D.Y., Li, Q.Y., Feng, L.J., Zhang, W., Ji, G., Xiao, J.C., Zhang, H.Z., and Wei, Q. (2014). Hypoxia inducible factor-1alpha suppresses Peroxiredoxin 3 expression to promote proliferation of CCRCC cells. *FEBS Lett* 588, 3390-3394.

Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., and Chen, H. (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112, 1821-1830.

Yang, S.B., Tien, A.C., Boddupalli, G., Xu, A.W., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (2012). Rapamycin ameliorates age-dependent obesity associated with increased mTOR signaling in hypothalamic POMC neurons. *Neuron* 75, 425-436.

Ye, J., Gao, Z., Yin, J., and He, Q. (2007). Hypoxia is a potential risk factor for chronic inflammation and adiponectin reduction in adipose tissue of ob/ob and dietary obese mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293, E1118-1128.

Yerramasu, A., Dey, D., Venuraju, S., Anand, D.V., Atwal, S., Corder, R., Berman, D.S., and Lahiri, A. (2012). Increased volume of epicardial fat is an independent risk factor for accelerated progression of sub-clinical coronary atherosclerosis. *Atherosclerosis* 220, 223-230.

Yin, J., Gao, Z., He, Q., Zhou, D., Guo, Z., and Ye, J. (2009). Role of hypoxia in obesity-induced disorders of glucose and lipid metabolism in adipose tissue. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296, E333-342.

Yin, X., Lanza, I.R., Swain, J.M., Sarr, M.G., Nair, K.S., and Jensen, M.D. (2014). Adipocyte mitochondrial function is reduced in human obesity independent of fat cell size. *J Clin Endocrinol Metab* 99, E209-216.

Ylikallio, E., and Suomalainen, A. (2012). Mechanisms of mitochondrial diseases. *Ann Med* 44, 41-59.

Zhang, H., Gao, P., Fukuda, R., Kumar, G., Krishnamachary, B., Zeller, K.I., Dang, C.V., and Semenza, G.L. (2007). HIF-1 inhibits mitochondrial biogenesis and cellular respiration in VHL-deficient renal cell carcinoma by repression of C-MYC activity. *Cancer Cell* 11, 407-420.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Remodelación del WAT inducida por dieta.	12
Figura 2. La mitocondria y sus funciones en el adipocito blanco.	16
Figura 3. Mecanismo de estabilización y activación de HIFalfa.	20
Figura 4. Ganancia de peso asociada a la edad.....	43
Figura 5. Cambio en el tamaño de los adipocitos durante la ganancia de peso asociada a la edad.	44
Figura 6. Contenido mitocondrial en adipocitos blancos.	45
Figura 7. La cantidad y actividad del complejo IV disminuye en adipocitos blancos de ratones envejecidos.	46
Figura 8. <i>Cox5b</i> , <i>Cox8a</i> , <i>Cox6c</i> y <i>Cox6a1</i> son más sensibles al envejecimiento en adipocitos que el resto de subunidades del complejo IV.	47
Figura 9. HIF1A se estabiliza en el eWAT durante el envejecimiento.	48
Figura 10. Generación de ratones deficientes para <i>Hif1a</i> . Modelo de actuación del tamoxifeno.	49
Figura 11. Niveles de delección de <i>Hif1a</i> en los diferentes modelos animales empleados.	50
Figura 12. La delección de <i>Hif1a</i> previene la ganancia de peso asociada a la edad.	51
Figura 13. La delección de <i>Hif1a</i> previene expansión del WAT asociada a la edad.	51
Figura 14. La delección de <i>Hif1a</i> en adipocitos previene la ganancia de peso y la expansión del WAT asociadas a la edad.....	53
Figura 15. HIF1A controla la expresión de algunas subunidades del complejo IV durante el envejecimiento.	54
Figura 16. Representación esquemática del gen y el promotor murino de <i>Cox5b</i>	56
Figura 17. La hipoxia impide a unión de c-MYC al promotor proximal de <i>Cox5b</i>	57
Figura 18. Nivel de silenciamiento de <i>Cox5b</i> en células 3T3-L1-shCOX5B.	58
Figura 19. El silenciamiento de <i>Cox5b</i> disminuye la estabilidad y la actividad del complejo IV.	59
Figura 20. El silenciamiento de <i>Cox5b</i> promueve la acumulación de lípidos y disminuye la oxidación de ácidos grasos <i>in vitro</i>	61
Figura 21. El silenciamiento de <i>Cox5b in vivo</i> aumenta el tamaño de los adipocitos en ratones jóvenes.....	62
Figura 22. El silenciamiento de <i>Cox5b in vivo</i> aumenta la proporción de adipocitos de tamaño grande en ratones jóvenes.	63
Figura 23. La sobreexpresión de COX5B es suficiente para aumentar la actividad del complejo IV <i>in vitro</i>	65

Figura 24. La sobreexpresión de <i>COX5B</i> <i>in vivo</i> disminuye el tamaño de los adipocitos en ratones envejecidos.	66
Figura 25. La sobreexpresión de <i>COX5B</i> <i>in vivo</i> contrarresta los efectos de la edad sobre el tamaño de los adipocitos.	67
Figura 26. La expresión de <i>COX5B</i> en VAT disminuye con la edad en humanos.	68
Figura 27. La expresión de <i>VDAC1</i> en VAT no varía con la edad en humanos.	69
Figura 28. Valor pronostico de <i>COX5B</i> en cirugía bariátrica.	70
Figura 29. Papel del complejo IV en la expansión del WAT asociada a la edad.	87

ANEXO I

El trabajo presentado en esta tesis doctoral se haya fundamentalmente descrito en el siguiente artículo:

Inés Soro-Arnáiz, Qilong Oscar Yang Li, Mar Torres Capelli, Florinda Meléndez-Rodríguez, Ainara Elorza, Sónia Veiga, Koen Veys, Daniel Tello, Pablo Hernansanz-Agustín, Jose Maria Moreno-Navarrete, Eduardo Balsa, Eduardo Romanos, Antonio Martínez-Ruiz, Jose Manuel Fernandez-Real, Antonio Zorzano, Katrien De Bock and Julián Aragonés. ***“Role of mitochondrial complex IV in age-dependent obesity”***. Cell Reports (ARTÍCULO EN PROCESO DE REVISIÓN)

Durante su periodo de formación la doctoranda ha participado además, en los siguientes trabajos:

Elorza A*, **Soro-Arnáiz I***, Meléndez-Rodríguez F, Rodríguez-Vaello V, Marsboom G, de Cárcer G, Acosta-Iborra B, Albacete-Albacete L, Ordóñez A, Serrano-Oviedo L, Giménez-Bachs JM, Vara-Vega A, Salinas A, Sánchez-Prieto R, Martín del Río R, Sánchez-Madrid F, Malumbres M, Landázuri MO, Aragonés J. ***“HIF2 α acts as an mTORC1 activator through the amino acid carrier SLC7A5”***. Mol Cell. 2012 Dec14;48(5):681-91.

* Primera posición de la autoría compartida.

Miró-Murillo M*, Elorza A*, **Soro-Arnáiz I***, Albacete-Albacete L, Ordoñez A, Balsa E, Vara-Vega A, Vázquez S, Fuertes E, Fernández-Criado C, Landázuri MO, Aragonés J. ***“Acute Vhl gene inactivation induces cardiac HIF-dependent erythropoietin gene expression”***. PLoS One. 2011;6(7):e22589.

* Primera posición de la autoría compartida.

Tello D, Balsa E, Acosta-Iborra B, Fuertes-Yebra E, Elorza A, Ordóñez Á, Corral-Escariz M, **Soro I**, López-Bernardo E, Perales-Clemente E, Martínez-Ruiz A, Enríquez JA, Aragonés J, Cadenas S, Landázuri MO. ***“Induction of the mitochondrial NDUFA4L2 protein by HIF-1 α decreases oxygen consumption by inhibiting Complex I activity”***. Cell Metab. 2011 Dec 7;14(6):768-79

ANEXO II

Acute *Vhl* Gene Inactivation Induces Cardiac HIF-Dependent Erythropoietin Gene Expression

Marta Miró-Murillo^{2,3}, Ainara Elorza^{1,3}, Inés Soro-Arnáiz^{1,3}, Lucas Albacete-Albacete¹, Angel Ordoñez¹, Eduardo Balsa¹, Alicia Vara-Vega¹, Silvia Vázquez¹, Esther Fuertes¹, Carmen Fernández-Criado², Manuel O. Landázuri¹, Julián Aragonés^{1*}

1 Department of Immunology, Hospital of La Princesa, Sanitary Research Institute Princesa (IP), Autonomous University of Madrid, Madrid, Spain, **2** Animal Facility, Autonomous University of Madrid, Madrid, Spain

Abstract

Von Hippel Lindau (*Vhl*) gene inactivation results in embryonic lethality. The consequences of its inactivation in adult mice, and of the ensuing activation of the hypoxia-inducible factors (HIFs), have been explored mainly in a tissue-specific manner. This mid-gestation lethality can be also circumvented by using a floxed *Vhl* allele in combination with an ubiquitous tamoxifen-inducible recombinase Cre-ER^{T2}. Here, we characterize a widespread reduction in *Vhl* gene expression in *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} adult mice after dietary tamoxifen administration, a convenient route of administration that has yet to be fully characterized for global gene inactivation. *Vhl* gene inactivation rapidly resulted in a marked splenomegaly and skin erythema, accompanied by renal and hepatic induction of the erythropoietin (*Epo*) gene, indicative of the *in vivo* activation of the oxygen sensing HIF pathway. We show that acute *Vhl* gene inactivation also induced *Epo* gene expression in the heart, revealing cardiac tissue to be an extra-renal source of EPO. Indeed, primary cardiomyocytes and HL-1 cardiac cells both induce *Epo* gene expression when exposed to low O₂ tension in a HIF-dependent manner. Thus, as well as demonstrating the potential of dietary tamoxifen administration for gene inactivation studies in UBC-Cre-ER^{T2} mouse lines, this data provides evidence of a cardiac oxygen-sensing VHL/HIF/EPO pathway in adult mice.

Citation: Miró-Murillo M, Elorza A, Soro-Arnáiz I, Albacete-Albacete L, Ordoñez A, et al. (2011) Acute *Vhl* Gene Inactivation Induces Cardiac HIF-Dependent Erythropoietin Gene Expression. PLoS ONE 6(7): e22589. doi:10.1371/journal.pone.0022589

Editor: Mauricio Rojas, University of Pittsburgh, United States of America

Received: December 7, 2010; **Accepted:** June 29, 2011; **Published:** July 21, 2011

Copyright: © 2011 Miró-Murillo et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by grants from Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2008-03407/BMC), RECAVA (RD06/0014/0031), CICYT (SAF2007-60592) and CAM (SAL0311/2006). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: jaragones.hlpr@salud.madrid.org

These authors contributed equally to this work.

Introduction

The ability of cells to respond to low O₂ supply (hypoxia) is fundamental in numerous pathological scenarios [1]. Hypoxia-inducible transcription factors (HIF) 1 α , 2 α and 3 α , prolyl hydroxylase domain proteins (PHDs) 1, 2 and 3 and the von Hippel-Lindau (VHL) protein are essential molecular elements in the cellular response to low O₂ supply. In normoxia, PHDs hydroxylate prolyl residues in the HIF α subunits that are then recognized by VHL, a protein of the multiprotein E3 ubiquitin ligase complex that marks them for degradation by the proteasome [2,3]. In conditions of hypoxia O₂ is limited and it is insufficient to hydroxylate prolyl residues in HIF α [4,5]. As a result, these HIF α isoforms are stabilized and form a heterodimer with the HIF β subunit, promoting the expression of many genes involved in cellular adaptation to hypoxia [6]. This includes the expression of erythropoietin (*Epo*) in the kidney and liver in order to facilitate oxygen delivery to hypoxic tissues [7,8,9,10]. Global *Vhl* gene inactivation in mice, and the ensuing HIF activation, can be used as a strategy to explore hypoxia signalling *in vivo*. However, conventional global *Vhl* gene inactivation is lethal in embryos [11], although this can be circumvented by only inducing *Vhl* gene inactivation in adult mice.

Widespread and acute gene inactivation in adult mice can be achieved through the ubiquitous expression of an inducible Cre

recombinase, which can be used to eliminate the *Vhl* allelic region flanked by two loxP sites (a floxed *Vhl* allele). The nuclear activity of Cre can be induced by fusing it to a mutant form of the human estrogen receptor (ER^{T2}) that does not recognize its natural ligand (17 β -estradiol) at physiological concentrations but rather, it binds the synthetic estrogen receptor ligand 4-hydroxytamoxifen (4-HT) [12]. This Cre-ER^{T2} is retained in the cytoplasm and only enters the nucleus in the presence of 4-HT, where it binds to loxP sites of the corresponding floxed alleles. Like other ubiquitous promoters, widespread Cre-ER^{T2} expression can be achieved in mice using the human ubiquitin C (UBC) promoter (UBC-Cre-ER^{T2} mice) [13]. Several means of administering tamoxifen have been described in rodents, including intraperitoneal injections and gavage [13]. However, the addition of 4-HT to powdered food or drinking water is a more convenient and less stressful means of inducing Cre recombinase activity in adult mice [14,15,16]. While the administration of tamoxifen via drinking water is hampered by its poor solubility, its delivery in food has been successfully achieved in several mouse lines [14,15,16]. However, to date, the full potential of a tamoxifen diet and its efficacy in inducing global Cre-ER^{T2} activity in different organs of a Cre-ER^{T2} transgenic mouse line (e.g. UBC-Cre-ER^{T2} mice) has not been fully explored.

Here we have successfully employed diet-based tamoxifen administration, a timesaving and convenient mean of delivering

tamoxifen in order to induce widespread inactivation of the *Vhl* gene in a *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} mouse line. After validating the efficiency of tamoxifen dietary administration, we characterized VHL/HIF oxygen-sensing dependent events that were rapidly induced by global *Vhl* inactivation *in vivo* (within just a few days) in contrast to other works that have mainly studied the *in vivo* consequences of *Vhl* gene inactivation over several weeks [17,18]. This study validates the use of the tamoxifen diet in UBC-Cre-ER^{T2} mouse lines for global gene inactivation, and it identifies an oxygen-sensing VHL/HIF pathway controlling extra-renal *Epo* gene expression in cardiac tissue.

Results

Postnatal tamoxifen diet-mediated *Vhl* gene inactivation

Global *Vhl* gene inactivation results in embryonic lethality, at least in part due to placental dysfunction [11], preventing the study of the global loss of this gene in adult mice. We were interested in the short-term effects of activating the oxygen-sensing HIF pathway *in vivo*, as a result of global *Vhl* gene inactivation in adult *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} mice through dietary tamoxifen administration. Since the full potential of dietary tamoxifen administration for global gene inactivation has not been explored previously, we first validated the efficacy of the tamoxifen diet in reducing *Vhl* gene expression in the *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} mouse line. Age-matched *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} as well as control mice *Vhl*^{flxed} and *Vhl*^{wt}-UBC-Cre-ER^{T2} were maintained for 10 days on an *ad libitum* diet of tamoxifen pellets (containing 400 mg/kg tamoxifen), before they were switched to a diet of normal chow for a further 10 days and *Vhl* gene expression was analyzed by quantitative real-time PCR in the different mouse organs. Hereinafter, the terms *Vhl*^{flxed}, *Vhl*^{wt}-UBC-Cre-ER^{T2} and *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} refer to mice that have been administered a tamoxifen diet as indicated above. The tamoxifen diet significantly reduced *Vhl* gene expression in the kidney, spleen, liver, skeletal muscle, brown adipose tissue (BAT), heart, lung and brain of *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} mice, reflecting widespread *Vhl* gene inactivation (Figure 1A). No differences in tamoxifen intake were observed between *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} and control mice (Figure 1B). Significantly, gene inactivation was not homogeneous and expression of the *Vhl* gene was more strongly downregulated in the kidney and spleen, and less so in other tissues such as the brain and lung (Figure 1A). To further validate the specificity of *Vhl* gene inactivation, we also quantified *Vhl* gene expression in another UBC-Cre-ER^{T2} system, the *Hif1α*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} mouse line and their corresponding *Hif1α*^{flxed} and *Hif1α*^{wt}-UBC-Cre-ER^{T2} control mice. While there were no significant differences in tamoxifen intake between the different lines (Figure 1D), *Hif1α* gene expression was dramatically and globally reduced, while *Vhl* gene expression was not affected in tamoxifen fed *Hif1α*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} mice (Figure 1C, E).

As mice were transiently exposed to a different diet, we evaluated their body weight before and after tamoxifen treatment. Baseline body weight diminished in a similar way (~10%) in *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} and control mice after 10 days on the tamoxifen diet (Figure 2). However, while the body weight of control mice returned to pre-tamoxifen levels just one day after switching back to a normal diet (Figure 2), that was not the case in *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} mice following tamoxifen treatment (Figure 2), suggesting that body weight was rapidly compromised by *Vhl* gene inactivation.

Gross appearance of mice shortly after acute *Vhl* inactivation

To further evaluate the efficacy of the tamoxifen diet on *Vhl* gene inactivation, we studied the biological consequences of acute

Vhl inactivation soon after the mice returned to a normal diet (10 days). We evaluated spleen size and skin erythema as macroscopic indicators of activation of the HIF oxygen-sensing pathway *in vivo* [19]. All tamoxifen-treated *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} mice analyzed exhibited marked splenomegaly when compared with controls (Figure 3 A, B). Moreover, some mice displayed obvious reddening of their paws and snouts (Figure 3 C, D). These external signs of skin erythema appeared as early as the ninth day of tamoxifen administration (data not shown), suggesting that this phenotype represents an acute manifestation of *Vhl* gene inactivation. Overall, these data confirm that dietary administration of tamoxifen is an efficient and convenient mean to induce widespread and rapid gene inactivation of floxed alleles in UBC-Cre-ER^{T2} mice and in particular, to study the short-term biological consequences of *Vhl* inactivation.

Acute *Vhl* inactivation induces cardiac *Epo* gene expression

Splenomegaly and erythema are recognized signs of activation of the oxygen-VHL/HIF/EPO pathway, and they have been reported previously in transgenic mice overexpressing EPO [20,21]. Given that the kidney and liver are the main sites of EPO production in adults [7,22,23], we investigated *Epo* gene expression in these organs in *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} mice shortly after *Vhl* gene inactivation. When we analyzed renal and hepatic *Epo* gene expression in tamoxifen-treated *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} mice, we found a strong induction of this gene in the kidney (~200 fold, Figure 4A) and an even stronger increase in the liver when compared to control mice (Figure 4B). The marked difference between these two organs is probably due to the very low basal levels of hepatic *Epo* gene expression, which results in more marked differences when *Vhl* is inactivated. These differences cannot simply be attributed to differences in *Vhl* inactivation, as *Vhl* is inactivated to a greater extent in the kidney than in the liver (Figure 1A). Moreover, serum EPO levels were drastically elevated in tamoxifen-treated *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} when compared with tamoxifen-treated control mice (pg of EPO/ml: 150.5±22.6 in *Vhl*^{flxed} versus 49835.5±21586 in *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2}; n = 4, p<0.05). These mice showed a remarkable reticulocytosis. Indeed, the number of circulating reticulocytes as well as splenic reticulocytes increases in *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} mice (Circulating reticulocytes ×10⁶/ml: 603.92±437 in *Vhl*^{flxed} versus 6391.53±1381 in *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2}; n = 3, p = 0.018) (Splenic reticulocytes ×10⁶/ml: 32±6.08 in *Vhl*^{flxed} versus 269.08±4.4 in *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2}; n = 3, p = 0.01). However, a parallel hemocytometry showed that hematocrit is not significantly elevated in tamoxifen-treated *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} when compared with control mice (hematocrit %: 40.8±2.02 in *Vhl*^{flxed} versus 43±5.3 in *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2}; n = 5, p=NS). Furthermore, a follow up of *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} mice revealed that they started to show anemia after a longer time period upon *Vhl* gene inactivation (hematocrit %: 42.62±2.22 in *Vhl*^{flxed} versus 33.2±3.8 in *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2}; n = 7, p = 0.041). In addition, the proportion of Hoechst 33342^{negative} CD71^{negative} cells decrease in the spleens of *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} (% of total number of splenic cells: 27.10±5.3 in *Vhl*^{flxed} versus 3.22±1.25 in *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2}; n = 3, p<0.01). This possibly reflects a specific VHL-dependent effect on mature red blood cells survival that will be further explored in futures studies.

In line with other studies, baseline *Epo* gene expression was particularly weak in the heart [8], although we found a remarkable elevation in cardiac *Epo* gene expression in tamoxifen fed *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} mice (Figure 4D). Given that cardiac *Vhl*

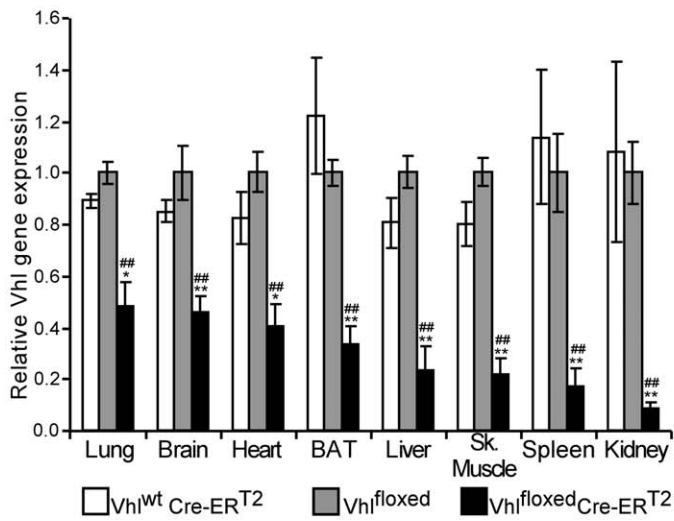
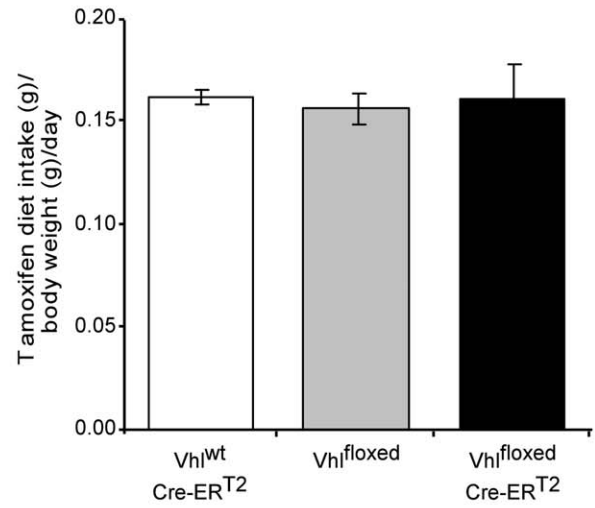
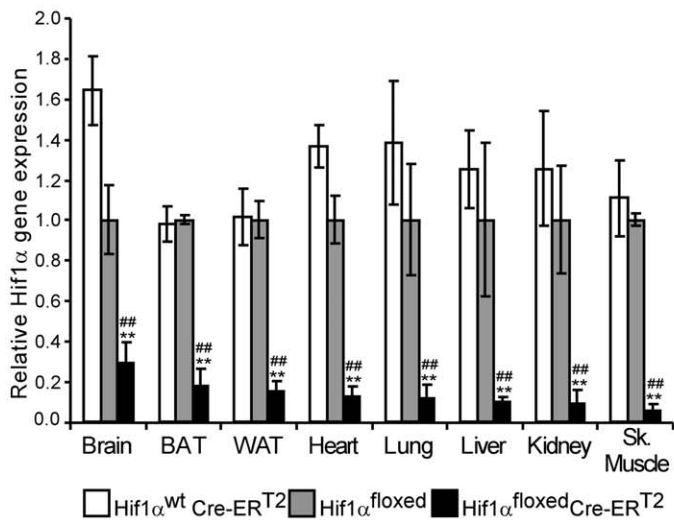
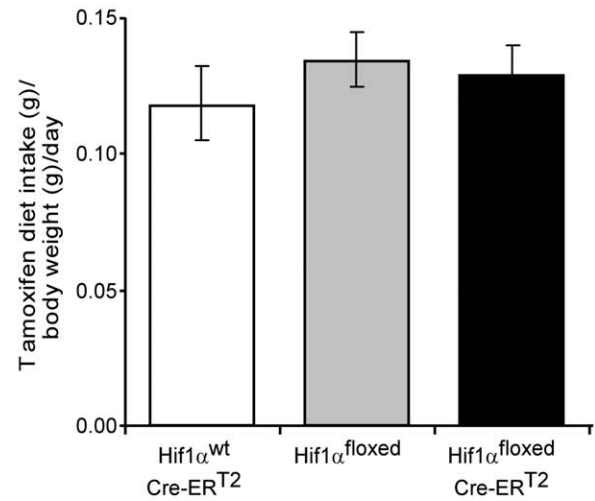
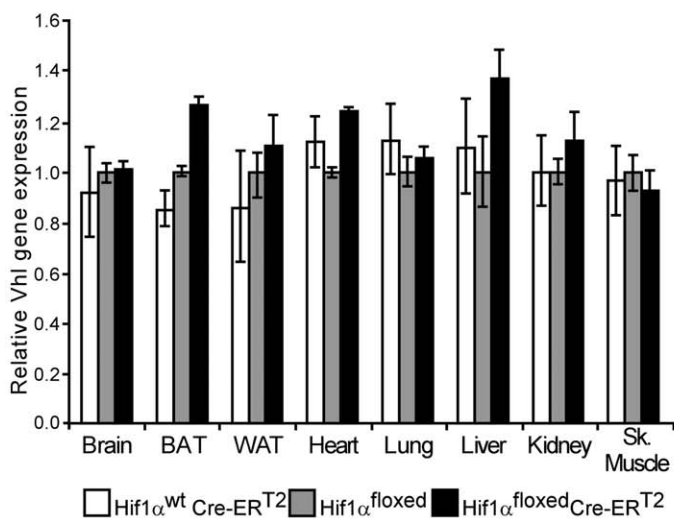
A**B****C****D****E**

Figure 1. *Vhl* and *Hif1α* gene expression in tamoxifen-fed *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} and *Hif1α*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} mice. (A) *Vhl*^{wt}-UBC-Cre-ER^{T2} (n=3), *Vhl*^{flxed} (n=6) and *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} (n=6) mice were placed on a tamoxifen diet for ten days followed by ten additional days on a normal diet. Gene expression was assessed by RT-PCR in the tissues indicated, the expression of the *Vhl* gene was normalized to that of *Hprt* and it was expressed as the change relative to *Vhl*^{flxed} mice. (B) Tamoxifen intake was measured over the 10 days of tamoxifen administration in *Vhl*^{wt}-UBC-Cre-ER^{T2} (n=3), *Vhl*^{flxed} (n=6) and *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} (n=6) mice. (C,E) *Hif1α*^{wt}-UBC-Cre-ER^{T2} (n=4), *Hif1α*^{flxed} (n=3) and *Hif1α*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} (n=5) mice were administered tamoxifen as indicated above. *Hif1α* (C) or *Vhl* (E) gene expression was normalized to that of *Hprt* and expressed as the change relative to *Hif1α*^{flxed} mice. (D) Tamoxifen intake in *Hif1α*^{wt}-UBC-Cre-ER^{T2} (n=4), *Hif1α*^{flxed} (n=3) and *Hif1α*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} (n=5) mice was measured as in B. Total intake per day was expressed relative to the body weight at the end of the tamoxifen treatment and the values represent the mean ± SEM. Statistical significance was assessed using a two-tailed Student's t-test, (*, p<0.05; **, p<0.01) when comparing *Vhl*^{wt}-UBC-Cre-ER^{T2} or *Hif1α*^{wt}-UBC-Cre-ER^{T2} with *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} or *Hif1α*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} respectively; (###, p<0.01) when comparing *Vhl*^{flxed} or *Hif1α*^{flxed} with *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} or *Hif1α*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} respectively.

expression is not fully ablated in tamoxifen-treated *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} mice (Figure 1A), we presumed that cardiac *Epo* gene expression could be potentially higher if *Vhl* deletion were more prominent. Expression of glucose transporter-1 (*Glut1*), a HIF-dependent gene [24], was also elevated in the hearts of tamoxifen treated *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} mice (Figure 4D). In addition, *Epo* gene expression was markedly upregulated in the brain (Figure 4C), possibly reflecting oxygen-sensing VHL/HIF-dependent EPO production in glial cells, as described previously [25]. Induction of *Epo* gene expression was stronger in cardiac tissue than in the brain, perhaps due to the weak basal expression of the *Epo* gene in the heart. These data suggest that the oxygen-sensing VHL/HIF/EPO pathway is not restricted to classical EPO-producing tissues, and they demonstrate that the heart can express EPO upon *Vhl* inactivation. To determine whether cardiomyocytes could be contributing to this VHL-dependent response, *Epo* gene expression was analyzed in isolated primary rat cardiomyocytes exposed to low oxygen tension. While weak basal expression of the *Epo* gene was observed in normoxic cardiomyocytes, hypoxia (1% O₂) augmented markedly its expression (Figure 5A). Likewise, *Glut1* expression was also induced, which indicates an effective induction of the HIF pathway in these experimental conditions (Figure 5B). We further evaluated the role of the HIF system in hypoxia-induced *Epo* gene expression in cardiac cells in

the HL-1 cell line, a well-recognized cardiac cell model that retains a differentiated cardiac myocyte phenotype and maintains contractile activity [26]. We specifically silenced expression of *Hif1α*, the main HIF isoform expressed at RNA level in this cardiomyocyte cell line (data not shown and Figure 6C). *Glut1* expression was induced by hypoxia in control scramble-transfected HL-1 cells but its expression was markedly attenuated in HL-1 cells transfected with siHIF1α (Figure 6B). Similarly, hypoxia-induced *Epo* gene expression was reduced when *Hif1α* was silenced in these cells (Figure 6A). These data indicate that hypoxia-induced *Epo* gene expression is an autonomous VHL/HIF-dependent cardiomyocyte response that occurs shortly after activation of this oxygen-sensing pathway. This response provides a molecular and cellular explanation for the elevated levels of cardiac *Epo* gene expression in *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} mice.

Discussion

The oxygen-sensing VHL/HIF dependent pathway plays a central role in cellular adaptation to oxygen fluctuations [27,28]. This role has primarily been explored in mouse models in which HIF is chronically overactivated following tissue-specific *Vhl* inactivation [22,25,29]. Here, we characterize the short-term *in vivo* responses following global inactivation of *Vhl* in the *Vhl*^{flxed}-

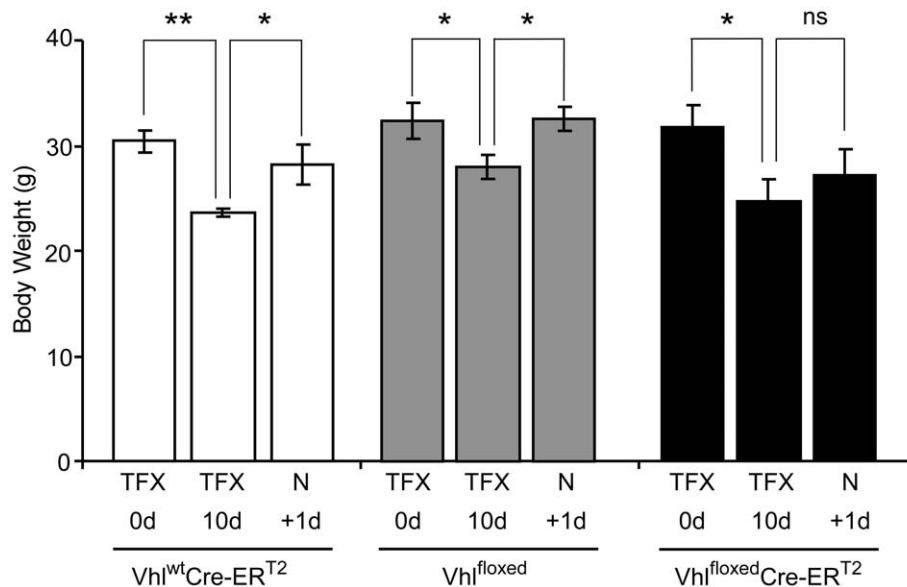


Figure 2. Body weight during and after tamoxifen diet administration in *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} and control mice. Body weight of *Vhl*^{wt}-UBC-Cre-ER^{T2} (n=3), *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} (n=6) control *Vhl*^{flxed} (n=6) mice was measured before tamoxifen treatment (TFX 0d), at the end of 10 days on a tamoxifen diet (TFX 10d) and one day after returning to a normal diet (N +1d). Statistical significance was assessed using a two-tailed Student's t-test, (*, p<0.05; **, p<0.01; ns, no significant differences).

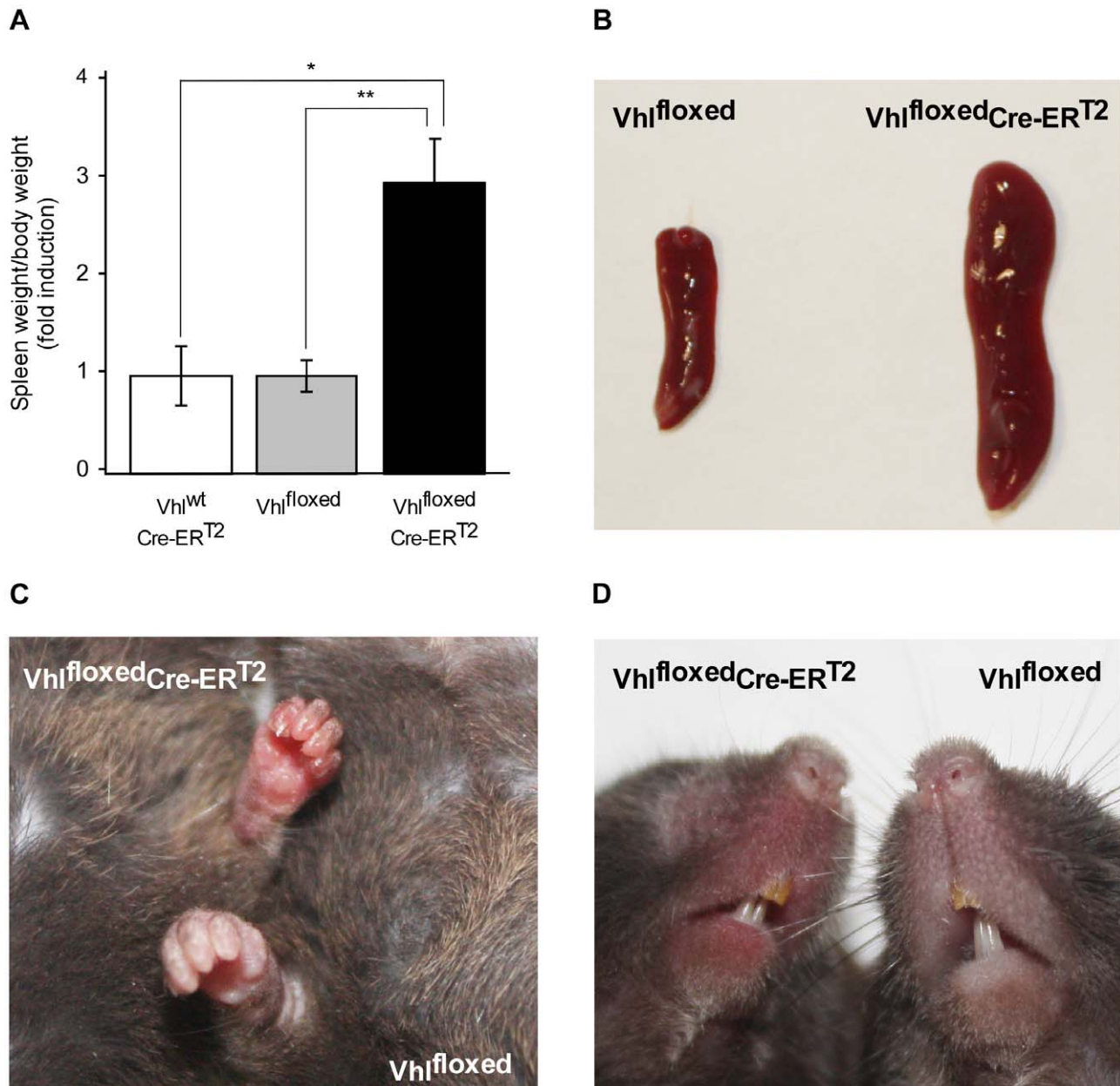


Figure 3. Gross appearance of tamoxifen-fed Vhl^{floxed}-Cre-ERT² mice. (A) Vhl^{wt}-UBC-Cre-ERT² (n=3), Vhl^{floxed} (n=9) and Vhl^{floxed}-UBC-Cre-ERT² (n=10) mice were administered tamoxifen as indicated in Figure 1 and the spleen/body weight ratio was then determined. Statistical significance was assessed using a two-tailed Student's t-test (*, p<0.05; **, p<0.01). Representative images of spleens (B), snouts (C) and paws (D) of Vhl^{floxed}-UBC-Cre-ERT² and control Vhl^{floxed} mice are shown.
doi:10.1371/journal.pone.0022589.g003

UBC-Cre-ERT² mouse line. For this purpose, we employed dietary administration of tamoxifen, a timesaving and convenient method of tamoxifen administration to induce Cre-ERT² activity. The full potential for global gene inactivation was not previously explored. Indeed, dietary administration of tamoxifen has been characterized in mice with specific Cre-ERT² expression in the heart, forebrain or in endothelial cells [14,15,16]. However, a comparative analysis of the efficiency of tamoxifen diet in different organs to determine its full potential to induce widespread gene inactivation has not been performed. Moreover, some of these studies have required several weeks on a tamoxifen diet. Here, we describe global gene inactivation in UBC-Cre-ERT² mouse lines shortly (a few days) after tamoxifen administration.

In this first place, it appears that UBC-Cre-ERT² is suitable to produce global gene inactivation in animals fed with a tamoxifen diet. However, tamoxifen-mediated *Vhl* gene inactivation was less pronounced in the Vhl^{floxed}-UBC-Cre-ERT² line than *Hif1α* gene inactivation in Hif1α^{floxed}-UBC-Cre-ERT² line, an effect that could not be attributed to differences in tamoxifen intake. This differential inactivation may reflect the specific efficacy of the Cre-ERT² recombinase to act on the floxed region of the *Vhl* and *Hif1α* alleles. Thus, optimization of the tamoxifen diet may be necessary to achieve comparable effects in distinct UBC-Cre-ERT² mouse lines. Nevertheless, the extent to which *Vhl* gene expression was reduced in these mice was sufficient to induce the activation of oxygen-sensing HIF pathways *in vivo*. Indeed, macroscopic

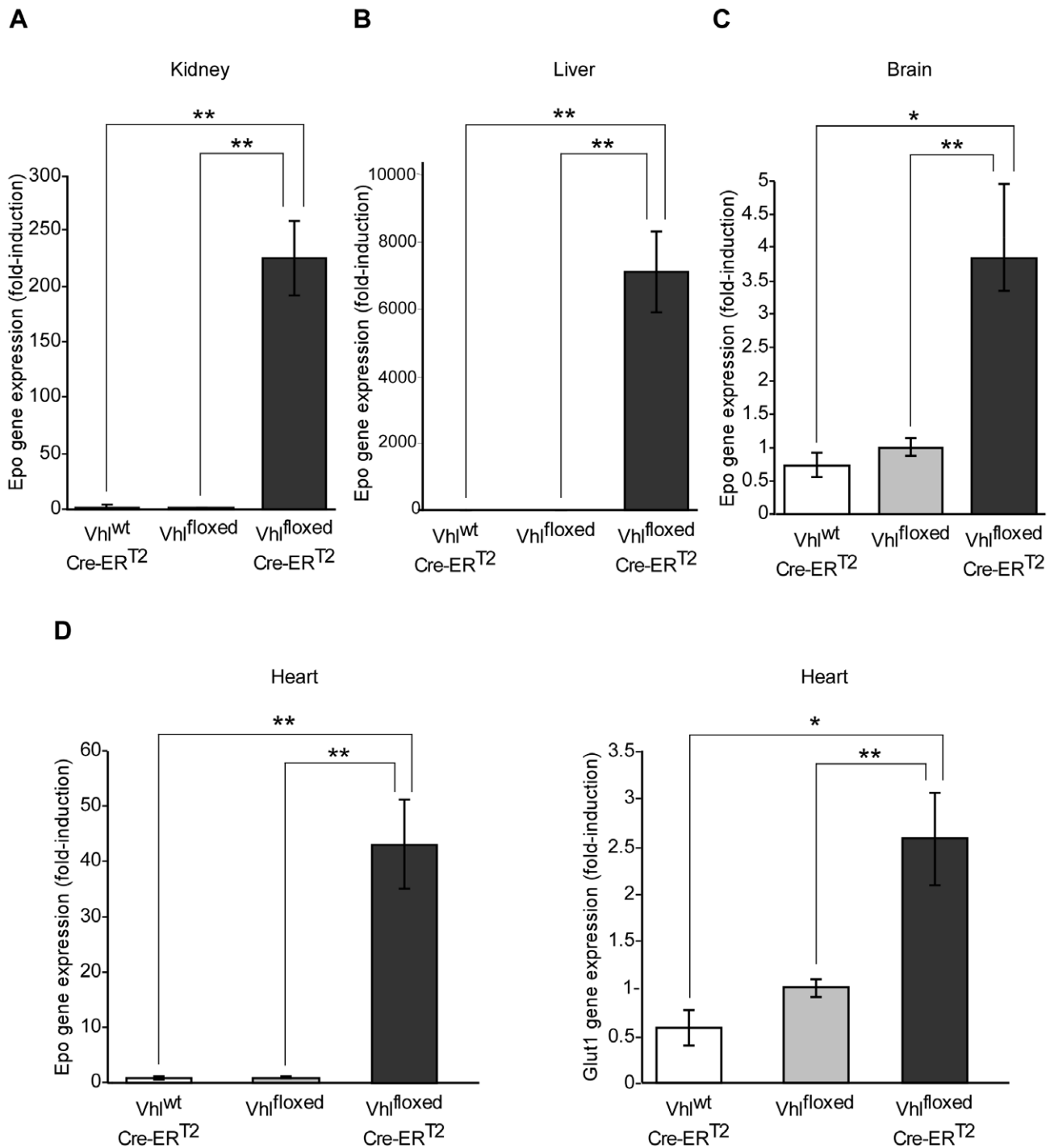


Figure 4. Erythropoietin gene expression in the kidney, liver, brain and heart of tamoxifen-fed Vhl^{floxed}-UBC-Cre-ERT² mice. Vhl^{wt}-UBC-Cre-ERT² (n=3), Vhl^{floxed} (n=6) and Vhl^{floxed}-UBC-Cre-ERT² (n=6) mice were administered tamoxifen as indicated in Figure 1. Gene expression was assessed by RT-PCR in the kidney (A), liver (B), brain (C) and heart (D). The expression of *Epo* and *Glut1* was normalized to that of *Hprt* and expressed as the change relative to Vhl^{floxed} mice. Statistical significance was assessed using a two-tailed Student's t-test (*, p<0.05; **, p<0.01). doi:10.1371/journal.pone.0022589.g004

examination of tamoxifen-treated Vhl^{floxed}-UBC-Cre-ERT² mice revealed marked splenomegaly, an indicator of increased activity of the oxygen-VHL/PHD/HIF sensing pathway, as seen in *Phd2* deficient and *Phd1:Phd3* double knock-out mice [19]. Tamoxifen-treated Vhl^{floxed}-UBC-Cre-ERT² mice also rapidly show signs of skin erythema (Figure 3). Indeed, reddening of the paws and snouts can be apparent as early as the ninth day of tamoxifen

administration (data not shown). This could reflect an increased blood flow to the skin as a consequence of local HIF-induced nitric oxide (NO) release and subsequent local vasodilatation as has been previously shown upon chronic epidermal *Vhl* deletion [30]. Boutin et al. also show that this increased cutaneous perfusion, as a consequence of epidermal *Vhl* gene inactivation, subsequently reduces liver/skin blood flow ratio leading to elevated hepatic *Epo*

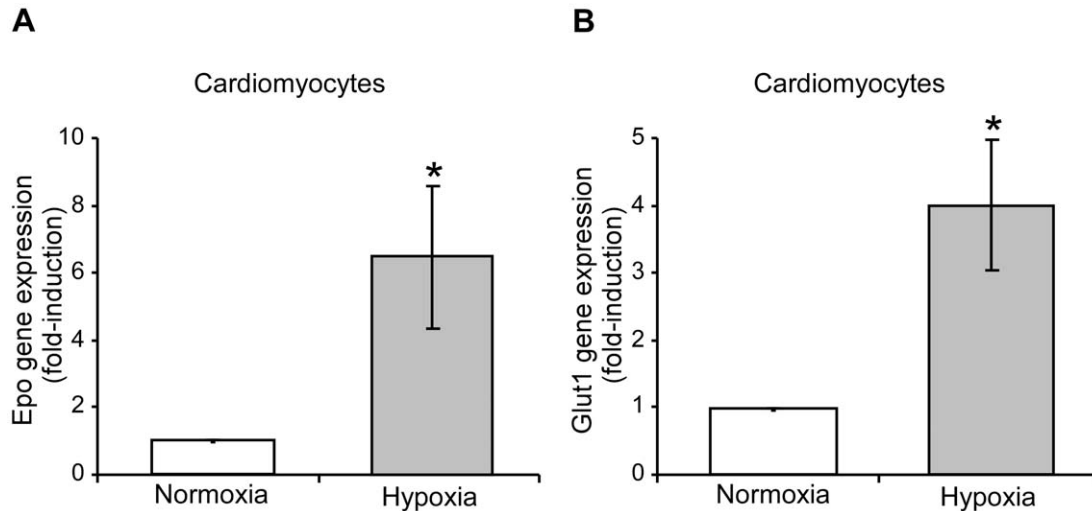


Figure 5. Erythropoietin and glucose transporter-1 gene expression in isolated primary cardiomyocytes in response to hypoxia. Isolated rat cardiomyocyte cultures were subjected to basal normoxic conditions and/or hypoxia (1% O₂) for 24 hours. *Epo* (A) and *Glut1* (B) expression was then analyzed by RT-PCR and normalized to that of *Hprt*. The data from four independent experiments are expressed as the change relative to the normoxic values. Statistical significance was assessed using a two-tailed paired t-test (*, $p < 0.05$). doi:10.1371/journal.pone.0022589.g005

gene expression [30]. However, the increased hepatic *Epo* gene expression observed in tamoxifen-treated *Vhl*^{flxed}Ubc-Cre-ER^{T2} mice is most likely a consequence of local *Vhl* gene deletion and HIF2 α activation in liver.

It should be noted that other similar genetic systems have been developed to achieve inactivation of floxed alleles. Indeed, the tetracycline-dependent (Tet) system has been used for renal-specific Cre expression and subsequent inactivation of the tuberous sclerosis complex-1 (*Tsc-1*) when doxycycline is administered in the drinking water [31]. However, some difficulties in

activating this doxycycline-dependent system in certain tissues have been reported [32,33,34]. By contrast, gene expression is significantly reduced in all the tissues analyzed from both *Vhl*^{flxed}Ubc-Cre-ER^{T2} and *Hif1 α* ^{flxed}Ubc-Cre-ER^{T2} mouse lines exposed to tamoxifen diet.

Tamoxifen-treated *Vhl*^{flxed}Ubc-Cre-ER^{T2} mice have identified the heart as an additional site of EPO production upon *Vhl* inactivation. Indeed, the baseline expression of the *Epo* gene in the heart is weak but is elevated dramatically upon inactivation of *Vhl* gene expression. Experiments on isolated neonatal rat cardiomy-

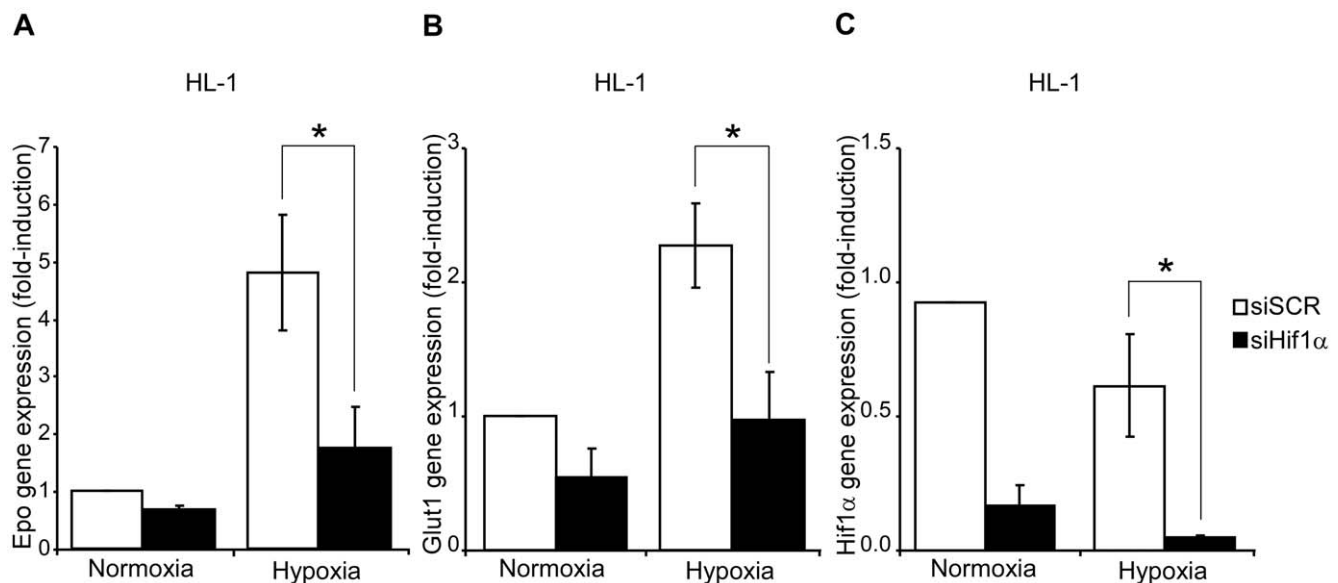


Figure 6. Erythropoietin and glucose transporter-1 gene expression in HL-1 cardiomyocyte cell line in response to activation of the oxygen-sensing HIF pathway. (A,B,C) HL-1 cells were transfected with a siRNA for *Hif1 α* (siHIF1 α) or a scrambled siRNA control (siSCR) and 24 hours after transfection, the cells were exposed to normoxic or hypoxic (1% O₂) conditions. The expression of *Epo*, *Glut1* and *Hif1 α* was measured as described above and the data from three independent experiments are expressed as the change relative to the normoxic values. Statistical significance was assessed using a two-tailed Student's t-test (*, $p < 0.05$). doi:10.1371/journal.pone.0022589.g006

ocytes revealed that EPO upregulation is an autonomous cardiomyocyte response to hypoxia that is mediated by the oxygen-sensing VHL/HIF pathway. This response is also observed in the HL-1 cardiac cell line, an experimental model suitable to study EPO production in adult cardiac cells. HL-1 is a cardiac cell line derived from the AT-1 adult mouse atrial cardiomyocyte tumor lineage, and these cells retain a differentiated cardiac myocyte phenotype and they maintain contractile activity [26]. Moreover, erythropoietin production has been demonstrated after myocardial infarction [35], which on the basis of our data could be mediated by cardiac HIF activation.

HIF1 α gene expression is higher than HIF2 α in HL-1 cells, which may explain the predominant contribution of HIF1 α to hypoxia-induced *Epo* gene expression in these cardiac cells. However, the relative contribution of each isoform may differ *in vivo* and indeed, immunohistological studies have identified both HIF1 α and HIF2 α in cardiomyocytes of mice subjected to ischemia or atmospheric hypoxia [36,37,38,39,40]. Hif1 α^{floxed} mice expressing Cre driven by myosin light chain 2v (MLC2v) cardiac promoter (Hif1 α^{floxed} -MLC2v-Cre mice) markedly reduced HIF1 α mRNA and protein expression in the heart, providing genetic evidence of *Hif1 α* gene expression in cardiomyocytes [36]. Several studies have demonstrated a critical role for HIF1 α in multiple cardiac oxygen-sensing pathways *in vivo* [29,36,41]. Thus, HIF1 α could potentially drive cardiac *Epo* gene expression upon *Vhl* gene inactivation. However, HIF2 α is the main contributor to HIF-induced *Epo* gene expression upon *Vhl* gene inactivation in the kidney, liver and glial cells [22,25,42,43]. Further studies will therefore be required to assess the relative contribution of these isoforms *in vivo*, and especially that of HIF2 α to VHL/HIF-dependent cardiac EPO expression. It should be also noted that HIF1 α and HIF2 α are also found in cardiac stromal cells. Indeed, cardiac endothelial cells abundantly express both HIF isoforms when oxygen supply to myocardium becomes limited, as do cells in the vessel wall that are presumably smooth muscle cells, [36,37,38,39,40]. Therefore, cardiac *Epo* gene expression upon *Vhl* gene inactivation involves HIF activation in cardiomyocytes, although we cannot rule out the involvement of HIF activation in other cardiac cell types.

Elevation of cardiac *Epo* gene expression is very remarkable, although it occurs to a lesser extent than in the liver and kidney. Therefore, it is conceivable that cardiac EPO production serves a local autocrine or paracrine function when oxygen supply to cardiac tissue becomes limited. Indeed, several studies have shown that EPO protects cardiac tissue during ischemia and the ischemia-reperfusion insult, particularly by overactivating the serine threonine kinase AKT, as well as through other pathways involving sonic hedgehog [44,45,46]. Indeed, the myocardium of patients undergoing bypass is protected when pyruvate, a previously recognized suppressor of PHD activity, is used [47], which correlates with a remarkable upregulation of *Epo* gene expression [48]. However, the effect of pyruvate on *Epo* gene expression was not directly assessed in cardiac cells, nor was the direct contribution of HIF activity, as we have studied in this work. Furthermore, cardiac tolerance to ischemic damage induced by ischemic preconditioning in the heart involves HIF1 α mediated upregulation of key cardioprotective molecules, such as ecto-5'-nucleotidase CD73 that generates adenosine, and the A2B adenosine receptor (A2BAR) [49]. Therefore, the cardiac oxygen-sensing VHL/HIF/EPO pathway may represent an endogenous cardioprotective response that works in tandem with other pathways (e.g. adenosine) to locally induce cardiomyocyte tolerance against ischemia or ischemia-reperfusion damage.

Materials and Methods

Ethics Statement

All the experimental procedures were approved by the Research Ethics Committee at the UAM (Autonomous University of Madrid) and they were carried out under the supervision of the Head of Animal Welfare and Health at the UAM in accordance with Spanish and European guidelines (B.O.E, 18 March 1988, and 86/609/EEC European Council Directives).

Cell culture and hypoxic conditions

The murine HL-1 cardiac cell line was cultured in Claycomb medium [26] containing 10% heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS; Cambrex) and supplemented with 0.1 mM norepinephrine (Sigma) and 2 mM GLUTAMAX-I (Invitrogen). Cells were plated on gelatin (Difco) and fibronectin (Sigma) precoated surfaces, and cultured at 37°C for 16 hours. Neonatal rat cardiomyocytes were isolated from the hearts of 1 day-old Wistar rats using the Neomyt isolation system (Cellutron Life Technologies). To remove contaminating cardiac fibroblasts, dissociated cells were pre-plated for 1 hour on uncoated culture plates. The resulting suspension of cardiomyocytes was plated (2–3 million cells/60 mm plate) and cultured for 24 hours in medium supplemented with 10% FBS and 10 mM 5-bromo-2'-deoxyuridine (BrdU; Sigma, B5002), and then for an additional 24 hours in serum-free conditions. The cells were subjected to hypoxia in DMEM + 10% FBS. All media were supplemented with 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin and 1% HEPES buffer. Normoxic cells (21% O₂) were maintained at 37°C in an incubator with 5% CO₂. To induce hypoxia, cell culture dishes were placed into an Invivo₂ 400 humidified hypoxia workstation (Ruskin Technologies, Bridgend, UK) with 1% O₂.

Mice

C;129S-*Vhl*^{tm1^{jae}}/J mice (Jackson Laboratories, stock no. 4081) were used to generate the *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} mice. These mice harbor two loxP sites flanking the promoter and exon 1 of the murine *Vhl* locus [50]. C;129S-*Vhl*^{tm1^{jae}}/J mice were crossed with B6.Cg-Tg(UBC-Cre/ER^{T2})1Ejb/J mice (Jackson Laboratories, stock no. 008085) which ubiquitously express a tamoxifen-inducible Cre recombinase (Cre-ER^{T2}), [13]. *Vhl*^{flxed}-UBC-Cre-ER^{T2} mice were generated through the appropriate crosses, along with the corresponding controls, *Vhl*^{wt}-UBC-Cre-ER^{T2} and *Vhl*^{flxed}. Hif1 α^{floxed} -UBC-Cre-ER^{T2} mice were generated from B6.129-Hif1a^{tm3R_{sjo}}/J mice (Jackson Laboratories, stock no. 007561), which harbor two loxP sites flanking exon 2 of the murine *Hif1 α* locus [51]. These mice were crossed with Tg(UBC-Cre/ER^{T2})1Ejb/J mice as described above to generate Hif1 α^{floxed} -UBC-Cre-ER^{T2} mice and their corresponding controls, Hif1 α^{wt} -UBC-Cre-ER^{T2} and Hif1 α^{flxed} mice.

The mice were bred and housed in a specific pathogen free (SPF) animal area of the animal facility at the Autonomous University of Madrid (UAM). For gene inactivation, *Vhl*^{wt}-UBC-Cre-ER^{T2}, Hif1 α^{wt} -UBC-Cre-ER^{T2} and the corresponding control males (10–5 weeks old) were fed *ad libitum* for ten days with Teckland CRD TAM⁴⁰⁰/CreER tamoxifen pellets (Harlan Teklad), which contain 400 mg tamoxifen citrate/kg. Subsequently, they were returned to a diet of standard mouse chow (Safe®, Augy, France) for an additional 10 days.

Reticulocyte counts and hematocrit measurement

The number of circulating or splenic reticulocytes was determined by counting total blood or splenic cells respectively followed by a flow cytometry analysis to determine the proportion of reticulocytes identified as CD71 positive cells (using the anti-

CD71-PE, Beckton-Dickinson) and low intracellular nucleic acid content (using the DNA dye Hoechst 33342) [52]. Similarly, splenic mature erythrocytes were identified as CD71 negative and Hoechst 33342 negative cells [52]. Hematocrit measurements were performed using a hemocytometer (apparatus SYSMEX KX-21N).

Quantitative real-time PCR analysis and primers

Mice were anaesthetized by intraperitoneal administration of ketamine (Ketalar® 50 mg/ml) and xylazine (Rompun® 20 mg/ml), and the tissues of interest were then removed and snap-frozen in liquid nitrogen. Subsequently, the tissue was homogenized in Trizol (Invitrogen) with two freeze/thaw cycles and total RNA was isolated using the RNeasy RNA extraction kit (Qiagen). cDNA was prepared by reverse transcription of RNA (1 µg) using Improm-II reverse transcriptase (Promega), and polymerase chain reaction (PCR) amplification was performed using a Power SYBR Green PCR Master Mix kit (Applied Biosystems). The following primer sets were used: mouse VHL (forward, 5'-TCAGCCC-TACCCGATCTTACC-3'; reverse, 5'-ATCCCTGAAGAGCC-AAAGATGA-3'); mouse HIF-1α (forward, 5'-CACCGATT-CGCCATGGA-3'; reverse, 5'-TCGACGTTTCAGAATCATC-TTTTT-3'); rat HIF-1α (forward, 5'-GTCCTGTGGTG-ACCTGTCTT-3'; reverse, 5'-TGGACTC TGATCATCT-GACCAA-3'); mouse erythropoietin (EPO) (forward, 5'-TCATCTGCGACAGTCGAGTTCT-3'; reverse, 5'-TTTTCT-ACCTAGTCTGGGACCTTCT-3'); rat erythropoietin (EPO) (forward, 5'-CAAGGAGGCAGAAAATGTCACA-3'; reverse, 5'-TTTCCAAGCGTAG AAGTTGACTTTG-3'); mouse glucose transporter 1 (GLUT1) (forward, 5'-CGCAACGAGGA-GAACC-3'; reverse, 5'-GCCGTG TTGACGATACC-3'); hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (HPRT) (forward, 5'-

GTTAAGCAGTACAGCCCCAAA-3'; reverse, 5'-AGGGCA-TATCCAACAAC AAACCTT-3'). The data were analyzed using StepOne Software version 2.0 (Applied Biosystems).

siRNA transfection

HL-1 cells were transfected with a siRNA targeting mouse HIF-1α (50 nM, sc-44225: Santa Cruz) or a scrambled control siRNA (sc-37007), using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. 24 hours after transfection the cells were exposed to normoxic or hypoxic conditions for an additional 24 hours.

Statistical analysis

The data are presented as the mean ± SEM. Statistical significance was assessed using a two-tailed Student's t-test in all figures, except in Figures 6A and B in which a two-tailed paired t-test was used.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr. L. del Peso, Dr. M.J. Calzada and Victoria Rodriguez for critical reading of the manuscript. The HL-1 cardiomyocyte cell line was kindly provided by Dr. William C. Claycomb (LSU Health Science Center, New Orleans, LA, USA).

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MM-M AE IS-A LA-A JA. Performed the experiments: MM-M AE IS-A LA-A AV-V SV. Analyzed the data: MM-M AE IS-A MOL JA. Contributed reagents/materials/analysis tools: AO EB AV-V SV EF CF-C. Wrote the paper: MM-M AE IS-A LA-A MOL JA.

References

- Giacchia A, Siim BG, Johnson RS (2003) HIF-1 as a target for drug development. *Nat Rev Drug Discov* 2: 803–811.
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, et al. (2001) HIF1α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 292: 464–468.
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, et al. (2001) Targeting of HIF-1α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292: 468–472.
- Bruick RK, McKnight SL (2001) A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294: 1337–1340.
- Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, et al. (2001) C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107: 43–54.
- Semenza GL (2007) Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Sci STKE* 2007: cm8.
- Eckardt KU, Kurtz A (2005) Regulation of erythropoietin production. *Eur J Clin Invest* 35(Suppl 3): 13–19.
- Fandrey J, Bunn HF (1993) In vivo and in vitro regulation of erythropoietin mRNA: measurement by competitive polymerase chain reaction. *Blood* 81: 617–623.
- Goldberg MA, Imagawa S, Strair RK, Bunn HF (1991) Regulation of the erythropoietin gene in Hep 3B cells. *Semin Hematol* 28: 35–40; discussion 40–31.
- Imagawa S, Goldberg MA, Bunn HF (1989) Regulation of the erythropoietin gene. *Adv Exp Med Biol* 271: 75–85.
- Gnarra JR, Ward JM, Porter FD, Wagner JR, Devor DE, et al. (1997) Defective placental vasculogenesis causes embryonic lethality in VHL-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 9102–9107.
- Feil R, Wagner J, Metzger D, Chambon P (1997) Regulation of Cre recombinase activity by mutated estrogen receptor ligand-binding domains. *Biochem Biophys Res Commun* 237: 752–757.
- Ruzankina Y, Pinzon-Guzman C, Asare A, Ong T, Pontano L, et al. (2007) Deletion of the developmentally essential gene ATR in adult mice leads to age-related phenotypes and stem cell loss. *Cell Stem Cell* 1: 113–126.
- Casanova E, Fehsenfeld S, Lemberger T, Shimshek DR, Sprengel R, et al. (2002) ER-based double iCre fusion protein allows partial recombination in forebrain. *Genesis* 34: 208–214.
- Forde A, Constien R, Grone HJ, Hammerling G, Arnold B (2002) Temporal Cre-mediated recombination exclusively in endothelial cells using Tie2 regulatory elements. *Genesis* 33: 191–197.
- Kiermayer C, Conrad M, Schneider M, Schmidt J, Brielmeier M (2007) Optimization of spatiotemporal gene inactivation in mouse heart by oral application of tamoxifen citrate. *Genesis* 45: 11–16.
- Ma W, Tessarollo L, Hong SB, Baba M, Southon E, et al. (2003) Hepatic vascular tumors, angiectasis in multiple organs, and impaired spermatogenesis in mice with conditional inactivation of the VHL gene. *Cancer Res* 63: 5320–5328.
- Young AP, Schlisio S, Minamishima YA, Zhang Q, Li L, et al. (2008) VHL loss actuates a HIF-independent senescence programme mediated by Rb and p400. *Nat Cell Biol* 10: 361–369.
- Takeda K, Aguila HL, Parikh NS, Li X, Lamothe K, et al. (2008) Regulation of adult erythropoiesis by prolyl hydroxylase domain proteins. *Blood* 111: 3229–3235.
- Heinicke K, Baum O, Ogunshola OO, Vogel J, Stallmach T, et al. (2006) Excessive erythrocytosis in adult mice overexpressing erythropoietin leads to hepatic, renal, neuronal, and muscular degeneration. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 291: R947–956.
- Vogel J, Kiessling I, Heinicke K, Stallmach T, Ossent P, et al. (2003) Transgenic mice overexpressing erythropoietin adapt to excessive erythrocytosis by regulating blood viscosity. *Blood* 102: 2278–2284.
- Rankin EB, Biju MP, Liu Q, Unger TL, Rha J, et al. (2007) Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. *J Clin Invest* 117: 1068–1077.
- Zanjani ED, Ascensao JL, McGlave PB, Banisadre M, Ash RC (1981) Studies on the liver to kidney switch of erythropoietin production. *J Clin Invest* 67: 1183–1188.
- Chen C, Pore N, Behrooz A, Ismail-Beigi F, Maity A (2001) Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J Biol Chem* 276: 9519–9525.
- Weidemann A, Kerdiles YM, Knaup KX, Rafie CA, Boutin AT, et al. (2009) The glial cell response is an essential component of hypoxia-induced erythropoiesis in mice. *J Clin Invest* 119: 3373–3383.
- White SM, Constantin PE, Claycomb WC (2004) Cardiac physiology at the cellular level: use of cultured HL-1 cardiomyocytes for studies of cardiac muscle cell structure and function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H823–829.

27. Mole DR, Ratcliffe PJ (2008) Cellular oxygen sensing in health and disease. *Pediatr Nephrol* 23: 681–694.
28. Semenza GL (2002) Involvement of hypoxia-inducible factor 1 in human cancer. *Intern Med* 41: 79–83.
29. Lei L, Mason S, Liu D, Huang Y, Marks C, et al. (2008) Hypoxia-inducible factor-dependent degeneration, failure, and malignant transformation of the heart in the absence of the von Hippel-Lindau protein. *Mol Cell Biol* 28: 3790–3803.
30. Boutin AT, Weidemann A, Fu Z, Mesropian L, Gradin K, et al. (2008) Epidermal sensing of oxygen is essential for systemic hypoxic response. *Cell* 133: 223–234.
31. Traykova-Brauch M, Schonig K, Greiner O, Miloud T, Jauch A, et al. (2008) An efficient and versatile system for acute and chronic modulation of renal tubular function in transgenic mice. *Nat Med* 14: 979–984.
32. Hochedlinger K, Yamada Y, Beard C, Jaenisch R (2005) Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues. *Cell* 121: 465–477.
33. Hsiao EC, Nguyen TD, Ng JK, Scott MJ, Chang WC, et al. (2011) Constitutive Gs activation using a single-construct tetracycline-inducible expression system in embryonic stem cells and mice. *Stem Cell Res Ther* 2: 11.
34. Katsantoni EZ, Anghelescu NE, Rottier R, Moerland M, Antoniou M, et al. (2007) Ubiquitous expression of the rTA2S-M2 inducible system in transgenic mice driven by the human hnRNP2B1/CBX3 CpG island. *BMC Dev Biol* 7: 108.
35. Mengozzi M, Latini R, Salio M, Sfacteria A, Piedimonte G, et al. (2006) Increased erythropoietin production after myocardial infarction in mice. *Heart* 92: 838–839.
36. Huang Y, Hickey RP, Yeh JL, Liu D, Dadak A, et al. (2004) Cardiac myocyte-specific HIF-1 α deletion alters vascularization, energy availability, calcium flux, and contractility in the normoxic heart. *FASEB J* 18: 1138–1140.
37. Jurgensen JS, Rosenberger C, Wiesener MS, Warnecke C, Horstrup JH, et al. (2004) Persistent induction of HIF-1 α and -2 α in cardiomyocytes and stromal cells of ischemic myocardium. *FASEB J* 18: 1415–1417.
38. Kim CH, Cho YS, Chun YS, Park JW, Kim MS (2002) Early expression of myocardial HIF-1 α in response to mechanical stresses: regulation by stretch-activated channels and the phosphatidylinositol 3-kinase signaling pathway. *Circ Res* 90: E25–33.
39. Stroka DM, Burkhardt T, Desbaillets I, Wenger RH, Neil DA, et al. (2001) HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *FASEB J* 15: 2445–2453.
40. Wiesener MS, Jurgensen JS, Rosenberger C, Scholze CK, Horstrup JH, et al. (2003) Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs. *FASEB J* 17: 271–273.
41. Cai Z, Zhong H, Bosch-Marce M, Fox-Talbot K, Wang L, et al. (2008) Complete loss of ischaemic preconditioning-induced cardioprotection in mice with partial deficiency of HIF-1 α . *Cardiovasc Res* 77: 463–470.
42. Kapitsinou PP, Liu Q, Unger TL, Rha J, Davidoff O, et al. (2010) Hepatic HIF-2 regulates erythropoietic responses to hypoxia in renal anemia. *Blood* 116: 3039–3048.
43. Warnecke C, Zaborowska Z, Kurreck J, Erdmann VA, Frei U, et al. (2004) Differentiating the functional role of hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and HIF-2 α (EPAS-1) by the use of RNA interference: erythropoietin is a HIF-2 α target gene in Hep3B and Kelly cells. *FASEB J* 18: 1462–1464.
44. Camici GG, Stallmach T, Hermann M, Hassink R, Doevendans P, et al. (2007) Constitutively overexpressed erythropoietin reduces infarct size in a mouse model of permanent coronary artery ligation. *Methods Enzymol* 435: 147–155.
45. Burger D, Xenocostas A, Feng QP (2009) Molecular basis of cardioprotection by erythropoietin. *Curr Mol Pharmacol* 2: 56–69.
46. Ueda K, Takano H, Niitsuma Y, Hasegawa H, Uchiyama R, et al. (2010) Sonic hedgehog is a critical mediator of erythropoietin-induced cardiac protection in mice. *J Clin Invest* 120: 2016–2029.
47. Lu H, Dalgard CL, Mohyeldin A, McFate T, Tait AS, et al. (2005) Reversible inactivation of HIF-1 prolyl hydroxylases allows cell metabolism to control basal HIF-1. *J Biol Chem* 280: 41928–41939.
48. Ryou MG, Flaherty DC, Hoxha B, Sun J, Gurji H, et al. (2009) Pyruvate-fortified cardioplegia evokes myocardial erythropoietin signaling in swine undergoing cardiopulmonary bypass. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: H1914–H1922.
49. Eckle T, Kohler D, Lehmann R, El Kasm K, Eltzschig HK (2008) Hypoxia-inducible factor-1 is central to cardioprotection: a new paradigm for ischemic preconditioning. *Circulation* 118: 166–175.
50. Haase VH, Glickman JN, Socolovsky M, Jaenisch R (2001) Vascular tumors in livers with targeted inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 1583–1588.
51. Ryan HE, Lo J, Johnson RS (1998) HIF-1 α is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *Embo J* 17: 3005–3015.
52. Chen SY, Wang Y, Telen MJ, Chi JT (2008) The genomic analysis of erythrocyte microRNA expression in sickle cell diseases. *PLoS One* 3: e2360.

Induction of the Mitochondrial NDUFA4L2 Protein by HIF-1 α Decreases Oxygen Consumption by Inhibiting Complex I Activity

Daniel Tello,^{1,5} Eduardo Balsa,^{1,5} Bárbara Acosta-Iborra,¹ Esther Fuertes-Yebra,¹ Ainara Elorza,¹ Ángel Ordóñez,¹ María Corral-Escariz,¹ Inés Soro,¹ Elia López-Bernardo,¹ Ester Perales-Clemente,² Antonio Martínez-Ruiz,¹ José Antonio Enríquez,^{2,3} Julián Aragonés,¹ Susana Cadenas,^{1,4} and Manuel O. Landázuri^{1,*}

¹Servicio de Inmunología, Hospital Universitario de La Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, Instituto de Investigación Sanitaria Princesa (IIS-IP), Madrid, 28006, Spain

²Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares Carlos III (CNIC), Madrid, 28029, Spain

³Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular, Facultad de Ciencias, Universidad de Zaragoza, Zaragoza, 50013, Spain

⁴Departamento de Biología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, 28049, Spain

⁵These authors contributed equally to this work

*Correspondence: mortiz.hlpr@salud.madrid.org

DOI 10.1016/j.cmet.2011.10.008

SUMMARY

The fine regulation of mitochondrial function has proved to be an essential metabolic adaptation to fluctuations in oxygen availability. During hypoxia, cells activate an anaerobic switch that favors glycolysis and attenuates the mitochondrial activity. This switch involves the hypoxia-inducible transcription factor-1 (HIF-1). We have identified a HIF-1 target gene, the mitochondrial *NDUFA4L2* (NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha subcomplex, 4-like 2). Our results, obtained employing *NDUFA4L2*-silenced cells and *NDUFA4L2* knockout murine embryonic fibroblasts, indicate that hypoxia-induced *NDUFA4L2* attenuates mitochondrial oxygen consumption involving inhibition of Complex I activity, which limits the intracellular ROS production under low-oxygen conditions. Thus, reducing mitochondrial Complex I activity via *NDUFA4L2* appears to be an essential element in the mitochondrial reprogramming induced by HIF-1.

INTRODUCTION

Aerobic organisms have developed specific systems to deliver oxygen to cells in different anatomical locations. However, insufficient oxygen supply and the ensuing hypoxia is a hallmark of different pathological situations. In response to hypoxia, cells activate a metabolic program that reduces oxygen consumption by actively lowering mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) activity, the main oxygen-consuming process in most cell types, accompanied by an increase in glucose uptake and the rate of glycolysis (Aragonés et al., 2008; Iyer et al., 1998; Kim et al., 2006; Papandreou et al., 2006). This hypoxic adaptation is due to the expression of genes triggered by hypoxia-inducible factors (HIFs) (Aragonés et al., 2009). HIFs are master transcription factors regulated in an O₂-dependent manner by a family of prolyl hydroxylases (PHDs), which use O₂ as

a substrate to hydroxylate HIF- α subunits in conditions of normoxia (Kaelin and Ratcliffe, 2008). These hydroxylated substrates are then ubiquitinated after recognition by VHL, and they are degraded by the proteasome. By contrast, PHD activity is inhibited in hypoxic conditions, and accordingly, HIF- α subunits accumulate, heterodimerize with HIF- β , and activate the expression of HIF-dependent target genes (Schofield and Ratcliffe, 2004; Semenza, 2004, 2009).

Among the genes whose expression is upregulated by HIFs are glucose transporters, like *GLUT1*, as well as key enzymes involved in glycolysis (Iyer et al., 1998). The *PDK1* and *PDK3* genes that code for pyruvate dehydrogenase (PDH) kinases are also upregulated, which results in increased phosphorylation and inactivation of PDH, the enzyme that converts pyruvate to acetyl-CoA (Kim et al., 2006; Lu et al., 2008; Papandreou et al., 2006). This process limits the substrate available for the tricarboxylic acid cycle (TCA) and thus for OXPHOS activity. Mitochondrial respiration is also regulated by additional mechanisms that maximize respiratory efficiency under conditions of reduced O₂ availability. Genes that regulate cytochrome c oxidase (the ETC Complex IV that reduces O₂ to H₂O) are also regulated by HIFs, including *COX4-2* isoform and the *LON* protease, which produces a switch from isoform *COX4-1* to *COX4-2* that optimizes the efficiency of respiration under hypoxic conditions (Fukuda et al., 2007).

Complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) is the largest and least understood component of the respiratory chain. This complex catalyzes the first step in the electron transport chain (ETC), transferring electrons from NADH to a noncovalently bound flavin mononucleotide (FMN) and then, via a series of iron-sulfur clusters (FeS), to the final ubiquinone acceptor. Complex I consists of 45 different subunits that are assembled into a structure of ~1 MDa, and while 7 subunits are encoded by mitochondrial DNA, the remaining 38 are coded for by the nuclear genome (Carroll et al., 2006). The activity of the Complex I is affected by hypoxia, either through posttranslational modification (Frost et al., 2005) or the reduced expression of mitochondrial genes (Chan et al., 2009). Here we report that HIF-1 induces the expression of the NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex subunit 4-like 2 gene (*NDUFA4L2*, also called

NADH-ubiquinone oxidoreductase MLRQ subunit homolog [NUOMS]), cataloged as a component of ETC Complex I due to its high sequence identity with *NDUFA4*. It was previously described using mRNA array technology that *NDUFA4L2* is over-expressed in VHL-deficient cell lines and tumors (Favier et al., 2009; Papandreou et al., 2006), as well as in neuroblastoma cells in hypoxia (Fredlund et al., 2008) and in pathophysiological conditions like rheumatoid arthritis (Andreas et al., 2009). Although the physiological function of this protein remains unclear, we show here that it is involved in lowering mitochondrial oxygen consumption and Complex I activity, thereby reducing ROS production. This provides a point in the regulation of mitochondrial activity that can reprogram Complex I activity under low-oxygen conditions.

RESULTS

Hypoxia Induces the Mitochondrial Protein *NDUFA4L2* in Primary Cultures and Tumor Cells In Vitro as well as In Vivo

We hypothesized that, as the principal electron acceptor, Complex I could be a key regulatory point in the control of the ETC during hypoxia. To identify Complex I components that might be regulated by moderate hypoxia, we used an mRNA array to analyze the expression of genes in HeLa cells maintained for short periods of time (6 hr) in 1% O₂. We detected the expression of 44 genes of Complex I in the array: 40 genes encoded by nuclear DNA and 4 encoded in the mitochondria (*ND1*, *ND2*, *ND3*, and *ND6*). Of all these genes, only *NDUFA4L2* was clearly induced by hypoxia, whereas the other genes encoded by nuclear DNA remained unchanged (Table S1). By contrast and as described previously (Piruat and López-Barneo, 2005), the other mitochondrially encoded genes underwent a marked downregulation in these hypoxic conditions (Table S1). It is important to note that *NDUFA4L2* gene is strongly induced by hypoxia. In fact, it appears among the first 12 genes more induced by hypoxia in the mRNA study (Table S2).

These microarray data were validated by RT-PCR on mRNA isolated from HeLa and PC-12 cells exposed to hypoxia. Indeed, RT-PCR assays confirmed that *NDUFA4L2* expression was strongly upregulated in response to hypoxia (Figure 1A), while such conditions did not change the levels of other Complex I genes encoded in the nucleus, such as *NDUFA4*, *NDUFAB1*, or *NDUFB4*, although *ND1* and *ND6* expression was downregulated (Figure S1A). Upregulation of *NDUFA4L2* expression was also observed in HUVEC and cardiomyocytes subjected to hypoxia and after treatment with PHD inhibitors such as dimethylxalylglycine (DMOG) and deferoxamine (Figure 1B). The efficacy of hypoxia and DMOG in these experiments was corroborated by the marked upregulation of previously recognized HIF target genes such as *PHD3*, *BNIP3*, and *GLUT1* (Figure S1B). In addition, *NDUFA4L2* expression was induced in brain tissue of mice exposed to 7.5% O₂ for 18 hr (Figure 1C). An increase in *NDUFA4L2* protein was also evident in response to hypoxia in different cell types and brain tissue (Figure 1D) with an antibody specific to this protein that did not recognize the homologous *NDUFA4* protein (Figure S1C). Moreover, the increase in *NDUFA4L2* protein induced by hypoxia was evident in cardiomyocytes when assessed by immunofluorescence (Figure 1E).

We analyzed the cellular localization of *NDUFA4L2* in normoxic and hypoxic conditions. A bioinformatics approach predicted that *NDUFA4L2* would be localized in mitochondria (Table S3), and this prediction was then confirmed experimentally by analyzing mitochondrial and cytoplasmic fractions from HeLa cells. *NDUFA4L2* was clearly enriched in the mitochondrial fraction under hypoxic conditions (Figure 1F), and immunofluorescence showed a clear colocalization of *NDUFA4L2* and cytochrome c in HL-1 cells (Figure 1G), as well as the colocalization of *NDUFA4L2* and the mitochondria-selective dye MitoTracker in HeLa cells (Figure S1D). These results confirmed the mitochondrial location of *NDUFA4L2*.

HIF-1 α Regulates *NDUFA4L2* Induction

To investigate whether hypoxia-induced *NDUFA4L2* expression was mediated by HIF transcription factors, we first silenced HIF-1 β , the common partner of HIF-1 α and HIF-2 α , thereby impairing the canonical HIF transcriptional response. Interference of HIF-1 β expression abolished the induction of *NDUFA4L2* during hypoxia (Figure 2A), as well as the response of *PHD3* (included as a control of HIF-target gene) (Figure S2A), indicating that HIF transcriptional activity is essential for *NDUFA4L2* induction.

To study the specific role of HIF-1 α and HIF-2 α in the response of *NDUFA4L2* to hypoxia, we performed RNA interference assays in human renal carcinoma RCC4 cells that constitutively stabilize HIF-1 α and HIF-2 α through the absence of VHL. Likewise, the response of *NDUFA4L2* was also assessed in RCC4/VHL cells in which VHL expression was restored, and hence both HIF-1 α and HIF-2 α were exclusively upregulated in response to hypoxia. In line with the role of HIF activity in *NDUFA4L2* regulation, there was a robust upregulation of *NDUFA4L2* in hypoxic RCC4/VHL cells, whereas there was marked and constitutive *NDUFA4L2* expression in normoxic RCC4 cells that was only minimally upregulated in hypoxic conditions (Figure 2B). HIF-1 α interference abrogated the expression of *NDUFA4L2* in both normoxic and hypoxic RCC4 cells (Figure 2B), as well as hypoxia-driven *NDUFA4L2* expression in RCC4/VHL cells (Figure 2B). By contrast, HIF-2 α interference did not affect the expression of *NDUFA4L2* in RCC4/VHL cells exposed to hypoxia, and no significant effect was observed in RCC4 cells in either normoxic or hypoxic conditions (Figure 2B). The control experiments for the interference assays showed a specific reduction of HIF-1 α or HIF-2 α mRNA expression (Figure S2B).

We further confirmed these data in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) from Hif-1 $\alpha^{+/+/f}$ /Cre conditional mice in which HIF-1 α was lost after tamoxifen treatment. As a control, we employed tamoxifen Hif-1 $\alpha^{+/+/f}$ /Cre MEFs that lacked the CRE recombination sites required for HIF-1 α ablation. The hypoxic induction of *Ndufa4l2* expression as well as that of the HIF target gene *Phd3* were only abrogated in Hif-1 $\alpha^{+/+/f}$ /Cre conditional MEFs following tamoxifen exposure, whereas they were still expressed in Hif-1 $\alpha^{+/+/f}$ /Cre MEFs (Figures 2C and S2C). Hence, the hypoxic induction of *Ndufa4l2* appeared to be mostly mediated by HIF-1 α .

To identify possible hypoxia response elements (HREs) responsible for the induction of *NDUFA4L2*, the proximal promoter region (intron 1) of *NDUFA4L2* was analyzed, identifying

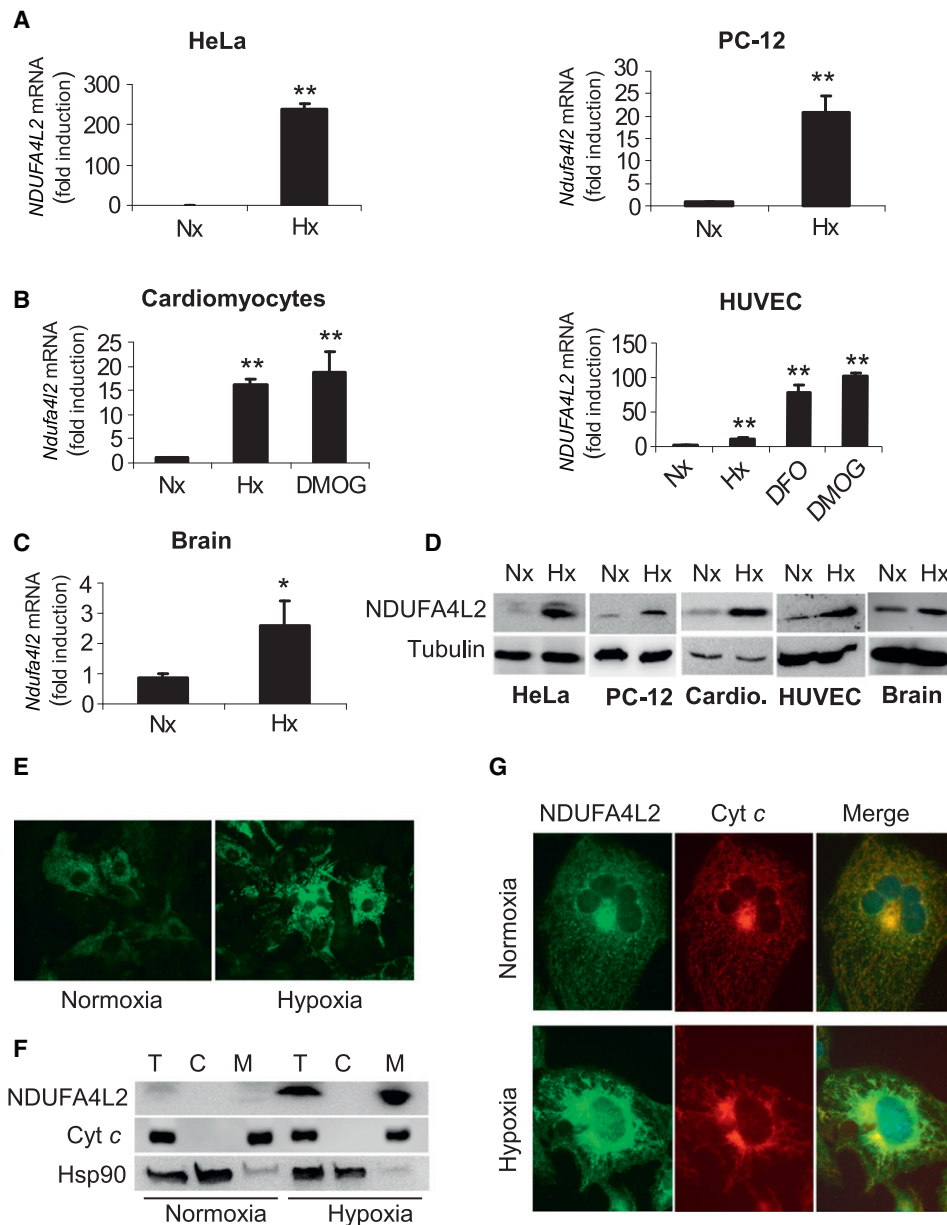


Figure 1. NDUFA4L2 Localizes to Mitochondria and Is Induced in Tumor Cells, in Primary Cultures, and In Vivo by Hypoxia

(A–C) Quantitative RT-PCR analysis of *NDUFA4L2* mRNA expression relative to the values in normoxia. HeLa, PC-12, cardiomyocytes, and HUVEC were cultured under conditions of normoxia or hypoxia (1% O₂) for 6 (HeLa) or 18 hr (PC-12, cardiomyocytes, HUVEC) (A and B). DMOG was added at 1 mM (cardiomyocytes) or 0.1 mM (HUVEC), and deferoxamine (DFO) was added at 0.2 mM in HUVEC (n = 3). Brain tissue from mice exposed to normoxic (n = 8) or hypoxic (7.5% O₂; n = 7) conditions for 18 hr is shown in (C).

(D) Immunoblot assay of NDUFA4L2 protein in HeLa, PC-12, HUVEC, or rat cardiomyocytes cultured under normoxic or hypoxic conditions (1% O₂ for cell cultures), as well as in brain tissue of mice subjected to hypoxia (7.5% O₂) for 18 hr. Tubulin is shown as a loading control. The images are representative of at least three experiments.

(E) Immunofluorescence showing the increase in NDUFA4L2 protein levels in rat cardiomyocytes exposed to normoxia or hypoxia (1% O₂) for 18 hr, with respect to those maintained in normoxic conditions. The images shown are representative of three experiments.

(F) Immunoblot assay of NDUFA4L2 in total cell (T), cytoplasmic (C), and mitochondrial (M) protein extracts from HeLa cells cultured under normoxic or hypoxic conditions (1% O₂) for 18 hr. Cytochrome c was assayed as a mitochondrial marker. The images shown are representative of three experiments.

(G) Immunofluorescence of HL-1 cells exposed to normoxia or hypoxia (1% O₂) for 18 hr. Images show staining for NDUFA4L2 (left panel, green) and cytochrome c (middle panel, red) and an overlay of the two signals (right panel). The images shown are representative of three experiments. See also Figure S1. n > 3; mean ± SEM; *p < 0.05; **p < 0.01.

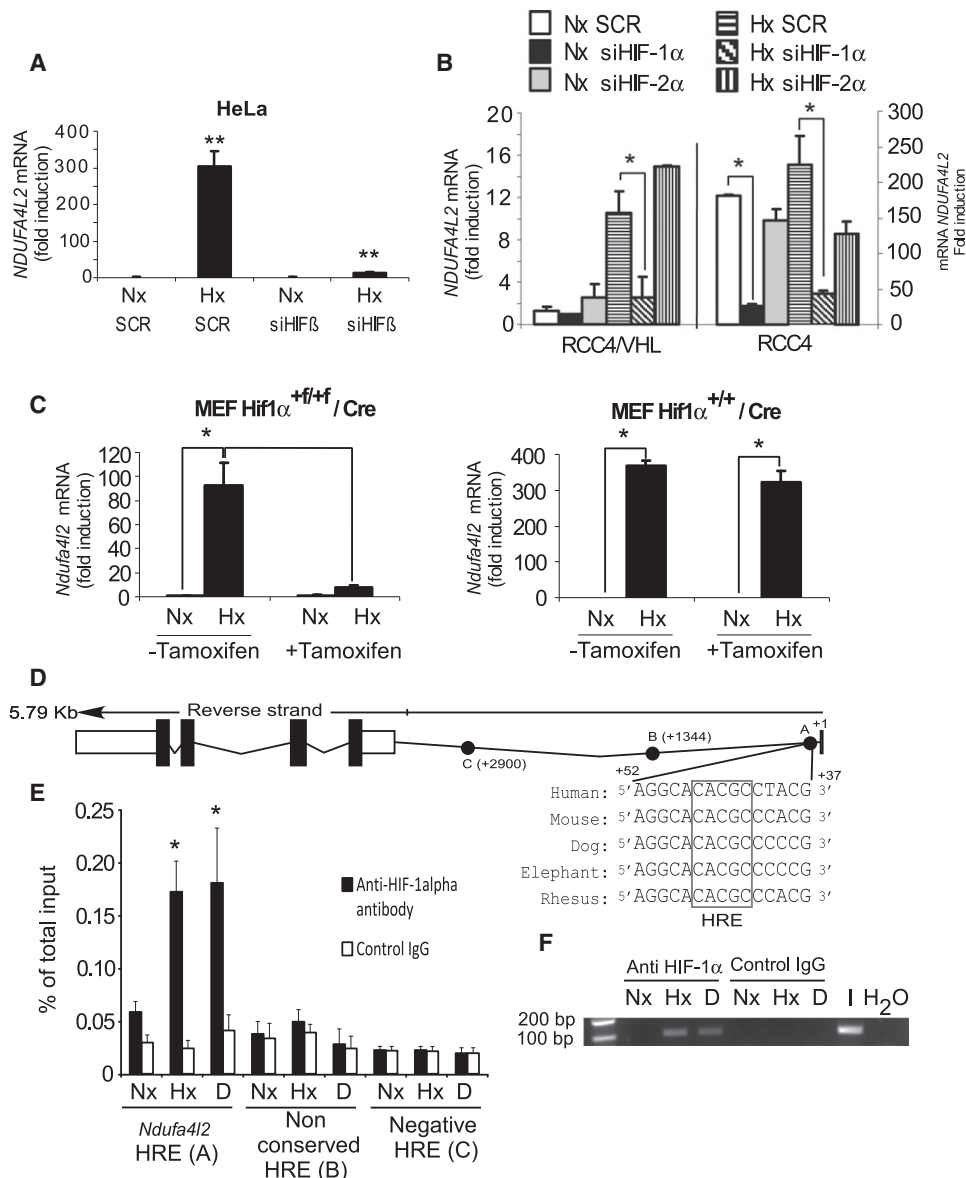


Figure 2. NDUFA4L2 Induction Is Mediated by HIF-1α

(A) HeLa cells transfected with siRNA against HIF-1α or a scramble control were cultured under normoxic or hypoxic (1% O₂) conditions for 24 hr. NDUFA4L2 mRNA levels were quantified by real-time RT-PCR.

(B) VHL-deficient RCC4 cells or RCC4/VHL cells were transfected with siRNA against HIF-1α, HIF-2α, or a scramble control and exposed under normoxic or hypoxic conditions (1% O₂) for 24 hr. NDUFA4L2 mRNA levels were quantified by real-time RT-PCR and are expressed relative to normoxic RCC4/VHL.

(C) Hif-1α^{+/+}/Cre MEFs and Hif-1α^{+/+}/Cre MEFs in the presence or absence of tamoxifen (1 μM) were cultured under normoxic or hypoxic conditions (1% O₂) for 18 hr. NDUFA4L2 mRNA levels were quantified by real-time RT-PCR.

(D) Schematic representation of the human NDUFA4L2 gene and the nucleotide sequences matching the consensus hypoxia response element (HRE) from five mammalian genes, indicating the regions A-B-C analyzed in the ChIP assay.

(E) ChIP assay of HIF-1α binding to the human NDUFA4L2 gene in HeLa cells cultured in normoxic or hypoxic conditions (1% O₂) or exposed to DMOG (0.1 mM) for 6 hr. RT-PCR quantification is shown of regions A (putative NDUFA4L2 HRE), B (nonconserved HRE), and C (negative HRE) after immunoprecipitation with HIF-1α or a control antibody, represented as the percentage of that quantified in the total input DNA.

(F) Representative gel of DNA amplified in the ChIP assays shown in (E). See also Figure S2. n > 3; mean ± SEM; *p < 0.05; **p < 0.01.

two putative HREs at +43 and +1344 (Figure 2D). The +43 site is highly conserved between different species, unlike the +1344 site. Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays were performed on HeLa cells grown under normoxic or hypoxic conditions and after treatment with DMOG. To evaluate HIF-1α

binding to NDUFA4L2 regulatory sequences, quantitative PCR (qPCR) was performed using specific primers for the putative HRE site (A), the nonconserved HRE site (B), and a negative site (C). ChIP assays for PDK1, a well-known HIF-1α target, were also performed as a positive control (Figure S2D). HIF-1α

binding to the *NDUFA4L2* proximal promoter containing conserved HRE site (A) was strongly induced by hypoxia and DMOG treatment (Figure 2E), but not to the nonconserved HRE site (B) or the negative control region (C). The sequence amplified by qPCR had the expected size (Figure 2F). Taken together, these results suggest that *NDUFA4L2* is a direct HIF-1 target gene.

NDUFA4L2 Is Involved in the Hypoxia-Induced Decrease in Oxygen Consumption and Prevents Increases in Membrane Potential and ROS Production during Hypoxia

To test whether *NDUFA4L2* is involved in the regulation of mitochondrial activity in hypoxia, we first determined the oxygen consumption in HeLa cells in which *NDUFA4L2* was silenced by specific siRNA. In these experiments, *NDUFA4L2* expression was typically reduced by 80% in hypoxic conditions (Figure S3A) while *NDUFA4* mRNA levels were not affected by the siNDUFA4L2 (Figure S3B), highlighting the specificity of the interference of *NDUFA4L2*. Indeed, *NDUFA4L2* interference reduced its protein expression in both normoxic and hypoxic conditions (Figure 3A), whereas the expression levels of proteins from other ETC complexes were unaffected by *NDUFA4L2* interference (Figure S3C). Oxygen consumption decreased approximately 42% in hypoxic conditions when compared to normoxia in control HeLa cells (Figure 3B). However, oxygen consumption only decreased by 27% in hypoxic conditions when *NDUFA4L2* was silenced in HeLa cells and when compared to control cells in normoxic conditions (Figure 3B). In normoxia, *NDUFA4L2* silencing increased oxygen consumption by only 10%, probably due to the low normoxic levels of *NDUFA4L2*. We also tested whether transient overexpression of *NDUFA4L2* might decrease oxygen consumption by using a pCMV-*NDUFA4L2* vector to achieve expression levels similar to those obtained in hypoxia (Figures 3C and S3D). Transient overexpression of *NDUFA4L2* decreased oxygen consumption in HeLa cells by approximately 20% (Figure 3D). Hence, we conclude that during hypoxia, *NDUFA4L2* induction decreases oxygen consumption.

Since attenuation of mitochondrial activity in hypoxia may be a compensatory mechanism to keep mitochondrial ROS under control, we wondered whether hypoxia-driven *NDUFA4L2* up-regulation could also participate in this antioxidant response. Previous studies used the fluorescent dye H₂DCFDA and flow cytometry to demonstrate an increase of mitochondrial ROS production when cells are exposed to low O₂ tensions (Brunelle et al., 2005; Guzy et al., 2005; Mansfield et al., 2005). Accordingly, we observed increased H₂DCFDA fluorescence in HeLa cells exposed to hypoxia (1% O₂) that was exacerbated when *NDUFA4L2* was silenced (Figure 3E). Similar data were obtained using the mitochondrial superoxide indicator MitoSOX (Figure 3F), which points to the mitochondrial origin of this increased superoxide production, probably from respiratory complexes. Increased ROS production in the absence of *NDUFA4L2* during hypoxia correlated with an increased mitochondrial membrane potential in these conditions (Figure 3G). Conversely, *NDUFA4L2* overexpression significantly decreased membrane potential compared to cells expressing the empty vector (Figure 3H).

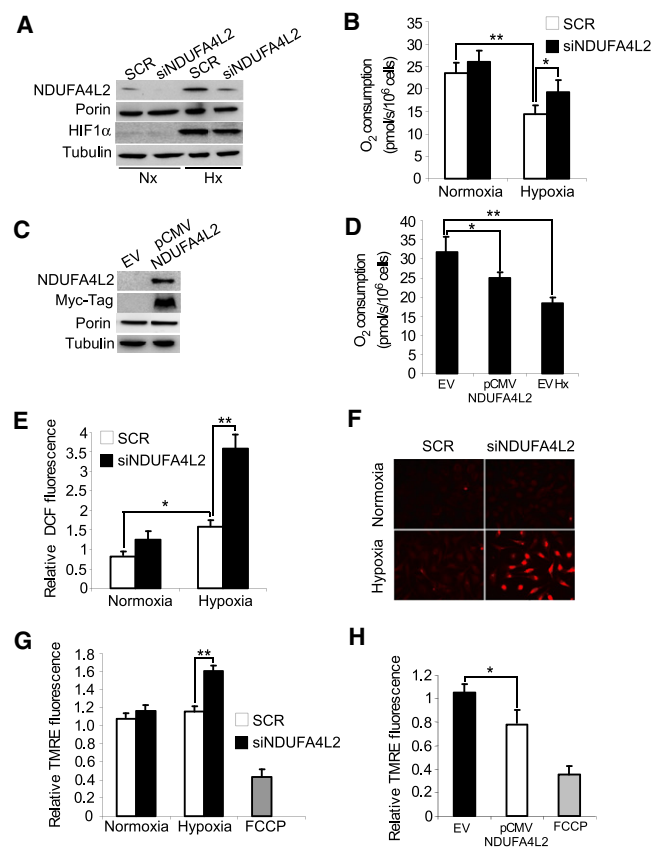


Figure 3. NDUFA4L2 Decreases Oxygen Consumption, Membrane Potential, and ROS Production in Hypoxia

(A–D) HeLa cells were transfected with a scramble control or *NDUFA4L2* siRNA and exposed to normoxic or hypoxic (1% O₂) conditions for 18–24 hr. Immunoblot analysis of *NDUFA4L2* and HIF-1 α protein levels using tubulin and mitochondrial porin as loading controls is shown in (A). The images are representative of four independent experiments. Oxygen consumption rates were measured by high-resolution respirometry (B). HeLa cells were transfected with the empty vector (EV) or pCMV-*NDUFA4L2* and then exposed to normoxic or hypoxic (1% O₂) conditions for 24 hr (C and D). Immunoblot analysis of *NDUFA4L2* and myc-tagged protein levels using tubulin and mitochondrial porin as loading controls are shown (C). The images are representative of four independent experiments. Oxygen consumption rates were measured by high-resolution respirometry (D).

(E) Relative DCF fluorescence as a measure of intracellular hydrogen peroxide levels.

(F) Representative images of four independent experiments showing MitoSOX intensity as a measure of mitochondrial superoxide levels.

(G and H) Mitochondrial membrane potential was determined with the fluorescent probe TMRE and expressed relative to the control cells in normoxia. FCCP was used as a positive control of mitochondrial membrane depolarization (n > 3; mean \pm SEM; *p < 0.05; **p < 0.01).

The Hypoxia-Induced Decrease in Oxygen Consumption via NDUFA4L2 Occurs through Complex I Inhibition

Given that *NDUFA4L2* appears to be a mitochondrial protein involved in the downregulation of hypoxia-induced oxygen consumption, and that it likely belongs to the *NDUFA4* subunit family of Complex I, we wondered whether *NDUFA4L2* might be involved in actively regulating Complex I activity. We found that, when compared to normoxic conditions, Complex I activity

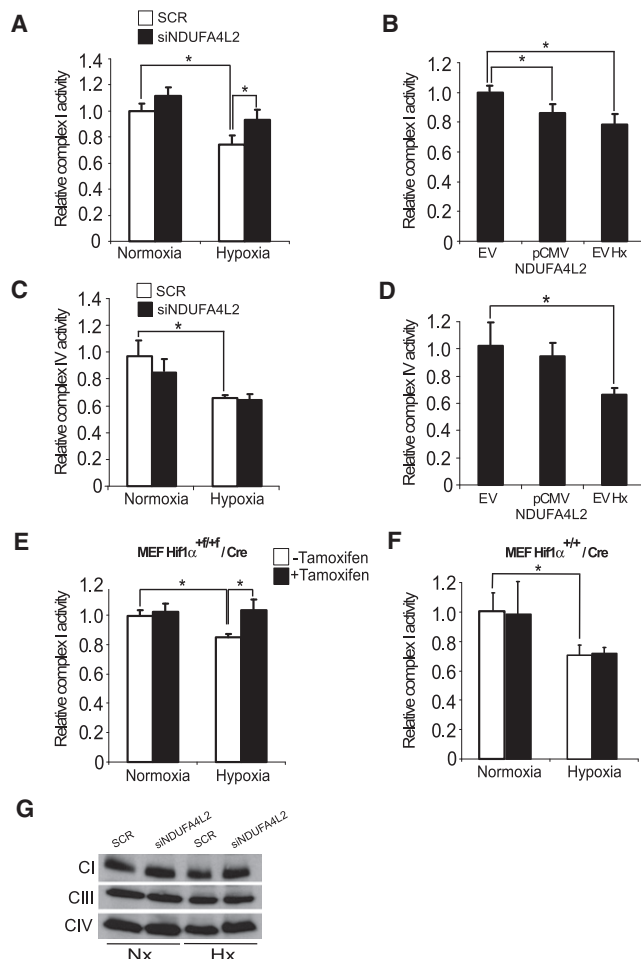


Figure 4. NDUFA4L2 Decreases Complex I Activity in Hypoxia

(A and B) Complex I activity was measured in HeLa cells transfected with a scramble control or NDUFA4L2 siRNA (A) or with the empty or pCMV-NDUFA4L2 vector (B), then exposed to normoxic or hypoxic (1% O₂) conditions for 24 hr.

(C and D) Complex IV activity was measured in HeLa cells transfected with a scramble control or NDUFA4L2 siRNA (C) and the empty or pCMV-NDUFA4L2 vector (D), then exposed to normoxic or hypoxic (1% O₂) conditions for 24 hr.

(E and F) Complex I activity was measured in Hif-1 $\alpha^{+/+/f}$ /Cre (E) or Hif-1 $\alpha^{+/+/f}$ /Cre MEFs (F) maintained in the presence or absence of tamoxifen (1 μ M) for 48 hr and cultured under normoxic or hypoxic (1% O₂) conditions for 18 hr.

(G) Blue native PAGE (BN-PAGE) analysis of the mitochondrial OXPHOS Complex I (NDUFA9), Complex III (Core 2), and Complex IV (Col) from scramble and NDUFA4L2 siRNA HeLa cells exposed to normoxic or hypoxic (1% O₂) conditions for 24 hr ($n > 3$; mean \pm SEM; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

decreased ~20% in HeLa cells exposed to hypoxia (1% O₂ for 24 hr), although it did not when NDUFA4L2 expression was silenced (Figure 4A). Moreover, transient overexpression of NDUFA4L2 decreased Complex I activity in normoxic conditions (Figure 4B), demonstrating that NDUFA4L2 regulates Complex I under low-oxygen conditions.

To study the specificity of the effects of NDUFA4L2 on Complex I, we also measured Complex IV activity. Hypoxia (1% O₂ for 24 hr) induced a 38% decrease in Complex IV activity in

HeLa cells (Figure 4C), but the silencing of NDUFA4L2 expression in hypoxia or its overexpression in normoxia did not affect Complex IV activity (Figures 4C and 4D). Similar results were obtained when Complex IV activity was determined spectrophotometrically (data not shown). Hence, NDUFA4L2 appears to affect ETC activity by specifically inhibiting Complex I. Since our results indicate that NDUFA4L2 is a HIF-1 α -dependent gene involved in the downregulation of Complex I activity in hypoxia, we further studied the role of HIF-1 in regulating Complex I. As expected, there was no decrease in Complex I activity following hypoxia in tamoxifen-treated Hif-1 $\alpha^{+/+/f}$ /Cre MEFs in which HIF-1 α was ablated (Figure 4E). By contrast, a decrease in Complex I activity similar to that seen in HeLa cells was evident in tamoxifen-treated Hif-1 $\alpha^{+/+/f}$ /Cre MEFs (~20%) (Figure 4F). These results suggest that the HIF-1 α -induced increase in NDUFA4L2 expression decreased oxygen consumption through the specific inhibition of mitochondrial Complex I activity.

Complex I activity can be modulated by its assembly (Vogel et al., 2005). We hypothesized that hypoxia-induced NDUFA4L2 could affect Complex I assembly. To test this possibility, we performed Blue native PAGE (BN-PAGE) in order to analyze the status of mitochondrial complexes. Neither hypoxia nor NDUFA4L2 silencing modified Complex I content, thus ruling out the involvement of NDUFA4L2 in the Complex I assembly process (Figure 4G).

Silencing of NDUFA4L2 Impairs Cell Proliferation in Hypoxia by Increasing Mitochondrial ROS Generation

While the absence of NDUFA4L2 does not significantly affect cell proliferation in normoxic conditions (Figure 5A), viable hypoxic NDUFA4L2-silenced HeLa cells proliferated at a slower rate than hypoxic control cells (Figure 5B). This slower proliferation was evident by both cell counting and by direct observation under the microscope (Figure 5C); it was also observed in other cell types such as HUVEC, UCD-Mel-N, and SKOV3 cells (Figure S4A). NDUFA4L2-silenced cells did not show either increased caspase-3 cleavage (Figure 5D) or changes in propidium iodide incorporation (Figure 5E), excluding the possibility that NDUFA4L2 silencing impaired cell proliferation by activating apoptosis. Additional studies showed that the capacity of hypoxic HeLa cells to form colonies in soft agar was affected when NDUFA4L2 was silenced, with a decrease in both the size and the number of colonies (Figure 5F). In order to investigate whether ROS overproduction in NDUFA4L2-silenced HeLa cells during hypoxia was responsible for the impairment in cell proliferation, we tested the effects of two different antioxidants, N-acetylcysteine (NAC) and MitoQ (an antioxidant targeted to mitochondria), on cell proliferation. Cell proliferation was restored when NDUFA4L2-silenced HeLa cells were treated with MitoQ in hypoxia (Figure 5G). This effect was also observed with NAC (Figure S4B), suggesting that exacerbated ROS production may be involved in the impairment of cell viability under hypoxia. Indeed, an increase in ROS production was detected in NDUFA4L2-silenced cells exposed to hypoxia using the mitochondrial superoxide indicator MitoSOX (Figure 5H). This increase was completely prevented by incubation with MitoQ (Figure 5H).

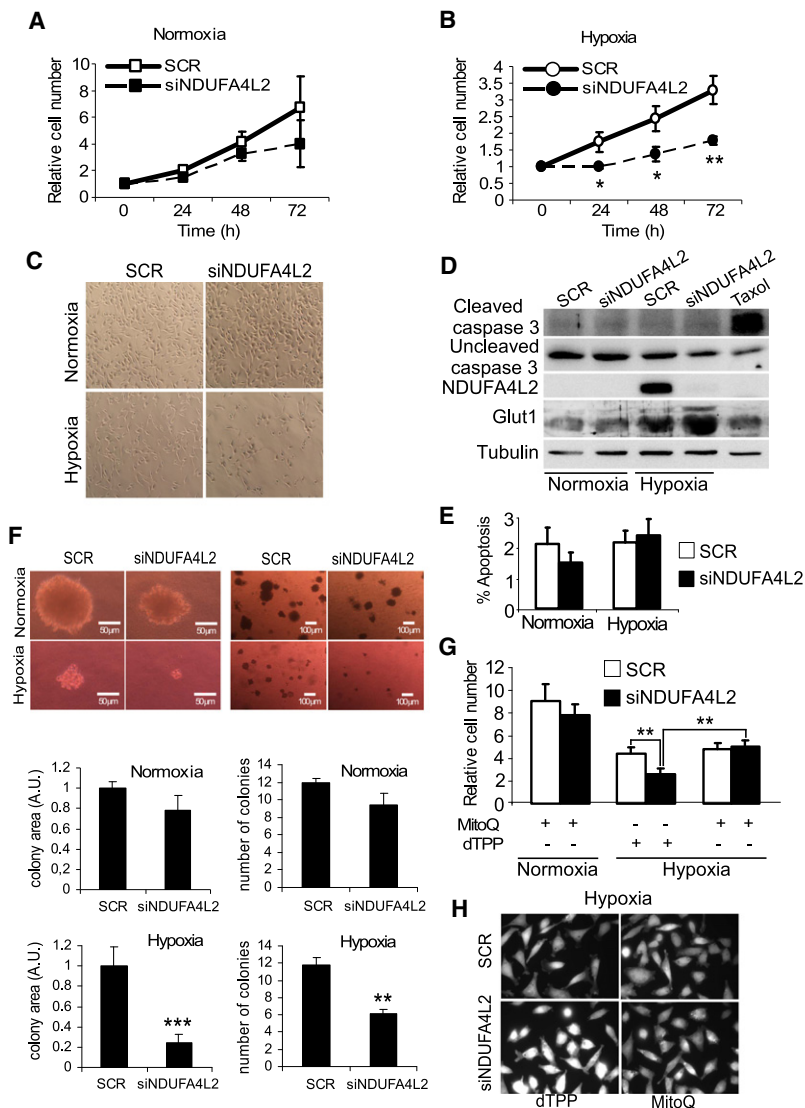


Figure 5. Reduced Hypoxic Levels of NDUFA4L2 Impair Cell Proliferation

(A and B) Growth curves of HeLa cells transfected with a scramble control or NDUFA4L2 siRNA in normoxic (A) and hypoxic (0.5% O₂) (B) conditions for different periods of time.

(C) Microscope images showing the density of HeLa cell cultures transfected with a scramble control or NDUFA4L2 siRNA and maintained under normoxic (21% O₂) or hypoxic (0.5% O₂) conditions for 72 hr.

(D) HeLa cells were transfected with either a scramble control or NDUFA4L2 siRNA and cultured under normoxic (21% O₂) or hypoxic (0.5% O₂) conditions for 72 hr, and the cell lysates were assayed in immunoblots that were probed with antibodies against NDUFA4L2, uncleaved caspase-3, and cleaved caspase-3. Glut1 was used as a positive control of hypoxic gene induction and tubulin as a loading control. Taxol was used as positive control of apoptosis.

(E) Scramble control or NDUFA4L2 siRNA HeLa cells maintained in normoxic (21% O₂) or hypoxic (0.5% O₂) conditions for 72 hr. The absolute value of apoptosis was measured by flow cytometry in cells stained with propidium iodide, as described in the [Experimental Procedures](#).

(F) Image of colony formation by HeLa cells transfected with a scramble control or NDUFA4L2 siRNA in normoxic and hypoxic (0.5% O₂) conditions in soft agar for 15 days. Both size and number of colonies were quantified.

(G) Growth of HeLa cells transfected with a scramble control or NDUFA4L2 siRNA in normoxic and hypoxic (0.5% O₂) conditions with or without 0.5 μM MitoQ (0.5 μM dTPP was used as control of MitoQ) at 72 hr.

(H) Fluorescence microscopy images of hypoxic (0.5% O₂) cultured scramble and siNDUFA4L2 HeLa cells treated either with 0.5 μM MitoQ or 0.5 μM dTPP (n > 3; mean ± SEM; *p < 0.05; **p < 0.01).

Cell-cycle analysis showed that hypoxic NDUFA4L2-silenced HeLa cells had increased early S phase and decreased late S phase compared to scramble control cells (Figure S4C). Since NDUFA4L2-silenced HeLa cells present ROS overproduction in hypoxia, and ROS can increase the phosphorylation of histone H2AX, a marker of cell stress (Driessens et al., 2009), we then analyzed the phosphorylation of H2AX histone. We observed increased phospho-H2AX levels in hypoxia when NDUFA4L2 was interfered (Figure S4D), suggesting that the lack of NDUFA4L2 in hypoxia produces cell stress.

It has been described that both the downregulation of the iron-sulfur cluster assembly proteins (ISCU1/2) via miR-210 and the upregulation of PDK1 are implicated in ROS control and cell viability in hypoxia (Chan et al., 2009; Chen et al., 2010; Favaro et al., 2010; Kim et al., 2006; Papandreou et al., 2006). To investigate the relative contribution of these effects to HeLa hypoxic adaptation, we performed cell proliferation assays. We only observed a decrease in ISCU1/2 protein at times over 24 hr at 0.5% (Figure S5A) but not in the milder hypoxic conditions

(1% O₂). Furthermore, the overexpression of ISCU1/2 did not affect HeLa cell proliferation in hypoxia (0.5% O₂) at 72 hr (Figure S5B). In addition, HeLa cells in which PDK1 was silenced by specific siRNA (Figure S5C) showed a decrease in proliferation under hypoxia (0.5% O₂) at 72 hr (Figure S5D) similar to that observed in NDUFA4L2-silenced cells, suggesting that both NDUFA4L2 and PDK1 play an important role in ROS control and cell proliferation in our system conditions.

MEFs Obtained from NDUFA4L2 Knockout Mice Exhibit Higher Oxygen Consumption and Complex I Activity in Hypoxia Than Wild-Type MEFs

In order to gain further insight into the role of NDUFA4L2 on hypoxia-induced mitochondrial reprogramming, we generated NDUFA4L2 knockout (KO) mice. We initially planned to isolate primary cell cultures from NDUFA4L2-deficient adult mice. However, we found that homozygous *Ndufa4l2* gene inactivation results in perinatal lethality, which demonstrates an essential biological role of NDUFA4L2 in development that will be further explored in future studies. Therefore, we isolated NDUFA4L2-deficient MEFs and the corresponding wild-type controls from E12.5–14.5 embryos generated from NDUFA4L2^{+/-} breeding pairs. In order to validate these MEF cultures, we analyzed the

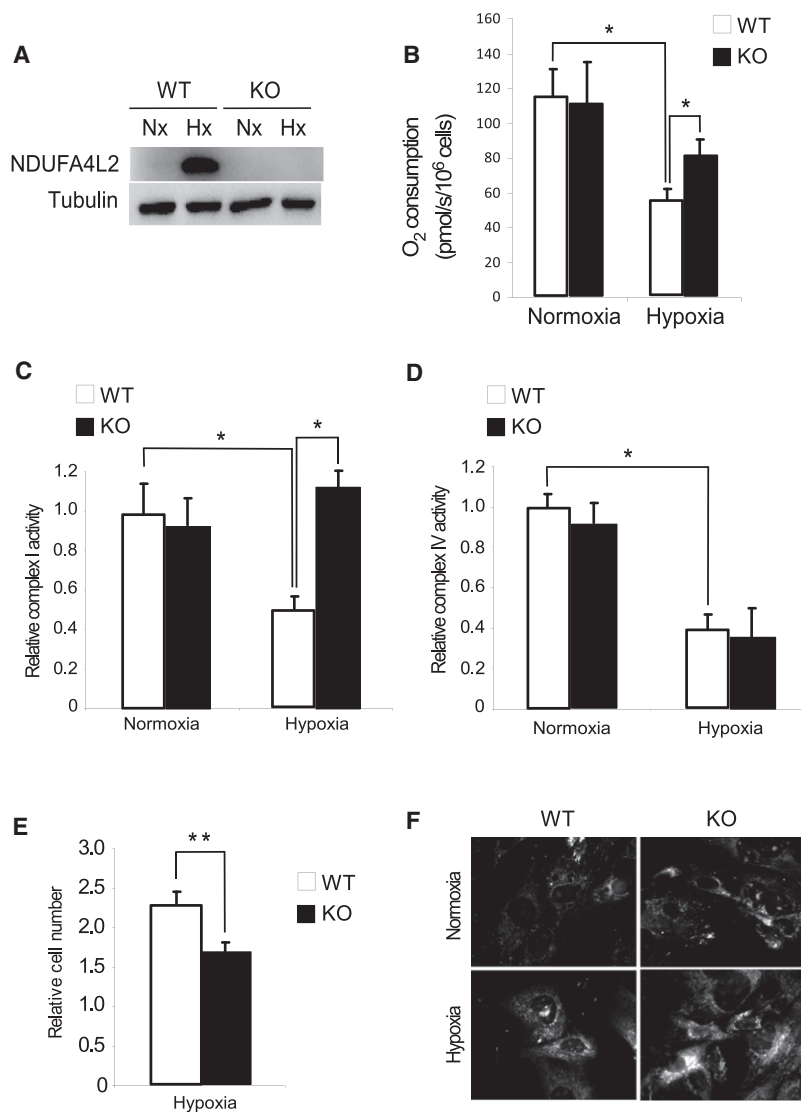


Figure 6. Analysis of NDUFA4L2-Deficient MEFs

(A–D) WT and KO MEFs were exposed to 0.5% hypoxia 24 hr prior to subsequent analysis. Immunoblot analysis showing the total deficiency of NDUFA4L2 is shown in (A). Tubulin was used as a loading control. Oxygen consumption rates were measured by high-resolution respirometry (Oxygraph 2k) (B). Complex I (C) and Complex IV (D) activities were measured spectrophotometrically and expressed relative to citrate synthase values. (E) Relative growth rates of WT and KO NDUFA4L2 MEFs cultured in hypoxia (0.5% O₂). (F) Representative images of three independent experiments showing MitoSOX intensity as a measure of mitochondrial superoxide levels (n > 3 mean ± SEM; *p < 0.05, **p < 0.01).

NDUFA4 Parologue Is Repressed under Hypoxia at the Protein Level

It is established that a COX4-2 to COX4-1 subunit substitution takes place at Complex IV during hypoxia (Fukuda et al., 2007). The parologue proteins NDUFA4L2 and NDUFA4 derive from the same ancestral gene, share more than 65% in their amino acid sequence, and have been suggested to be part of mitochondrial Complex I (Walker et al., 1992). Since NDUFA4 mRNA levels do not change in hypoxia up to 48 hr (Figure 7A), we investigated the fate of the protein under hypoxia. We found that NDUFA4 protein decreases in hypoxic cells while NDUFA4L2 protein expression increases in hypoxic conditions (Figure 7B). We also explored whether NDUFA4L2 levels would be responsible for the downregulation of NDUFA4. NDUFA4 protein levels decreased in hypoxia even when NDUFA4L2 was silenced (Figure 7C), and its expression in normoxia was unaffected by NDUFA4L2 overexpression (Figure 7D). NDUFA4 protein decreases to the same extent

in NDUFA4L2 KO MEFs, demonstrating that both events occur independently (Figure 7E). Collectively, all these data indicate that NDUFA4L2 KO MEFs markedly repress NDUFA4 protein levels in hypoxia while Complex I activity is not affected, ruling out the possibility that Complex I activity is repressed in hypoxia via NDUFA4. These data stress the specific role of hypoxia-dependent NDUFA4L2 upregulation in Complex I activity inhibition.

expression of NDUFA4L2. Western blot analysis confirmed that NDUFA4L2 increased in hypoxia in MEFs from wild-type mice only (Figure 6A). We determined oxygen consumption in MEFs obtained from NDUFA4L2 KO and wild-type mice (Figure 6B). Confirming results obtained in HeLa cells, MEFs from NDUFA4L2 KO mice showed increased respiration rate in hypoxia compared to wild-type mice (Figure 6B). The activity of Complex I in hypoxia was higher in MEFs from KO mice than in those from wild-type mice, confirming the results obtained in HeLa cells (Figure 6C). In contrast, the activity of Complex IV in hypoxia was similarly decreased in both types of MEFs (Figure 6D). The expression level of respiratory complexes was studied by BN-PAGE using DDM (n-dodecyl beta-D-maltoside), obtaining the same result as in HeLa cells (data not shown). In addition, MEFs from NDUFA4L2 KO mice exhibited a lower proliferation rate than those from wild-type mice when cultured under hypoxia (Figure 6E), and this lower proliferation correlated with increased ROS production under hypoxic conditions (Figure 6F).

in NDUFA4L2 KO MEFs, demonstrating that both events occur independently (Figure 7E). Collectively, all these data indicate that NDUFA4L2 KO MEFs markedly repress NDUFA4 protein levels in hypoxia while Complex I activity is not affected, ruling out the possibility that Complex I activity is repressed in hypoxia via NDUFA4. These data stress the specific role of hypoxia-dependent NDUFA4L2 upregulation in Complex I activity inhibition.

DISCUSSION

The influence of fluctuations in oxygen concentration on mitochondrial activity has raised a great interest due to its broad impact on pathophysiology. Mitochondrial respiration is only compromised when the oxygen concentration drops below 0.1% O₂ because of the high affinity of mitochondrial cytochrome c oxidase (Complex IV) for oxygen (Aguirre et al., 2010; Gnaiger et al., 1998; Smolenski et al., 1991; Stumpe and Schrader, 1997). However, during moderate hypoxia (1%–2% O₂), cells

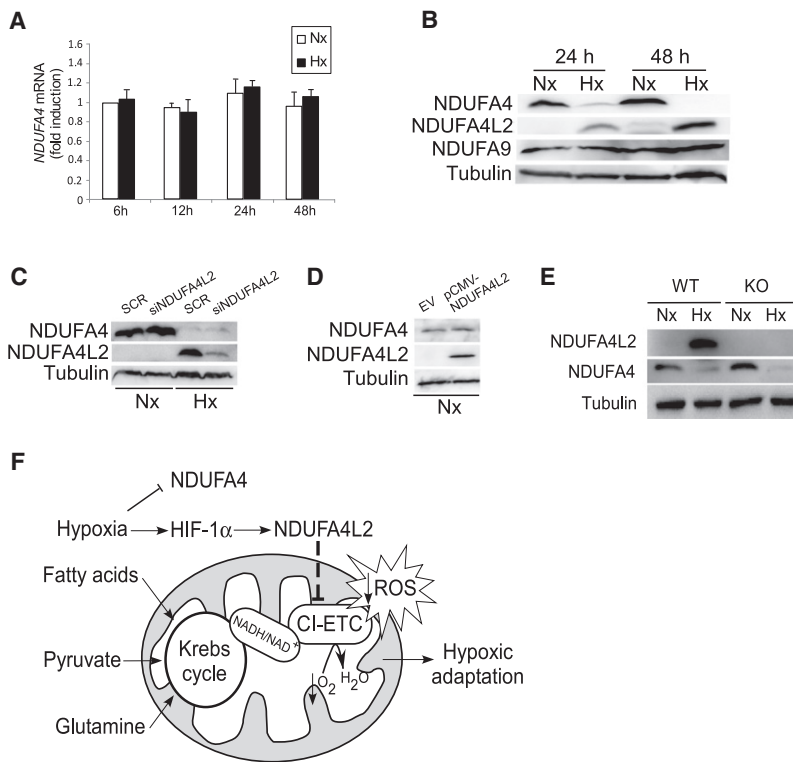


Figure 7. Opposite Regulation of NDUFA4 and NDUFA4L2 under Hypoxia

(A) HeLa cells were cultured under hypoxia (1% O₂) for 6, 12, 24, and 48 hr, and *NDUFA4* mRNA levels were analyzed.

(B) Immunoblot analysis of HeLa cells subjected to either 24 or 48 hr of hypoxia and probed against NDUFA4 and NDUFA4L2 antibodies. NDUFA9 was used as a loading control for Complex I, and tubulin was used as a total loading control.

(C and D) HeLa cells were transfected with a scramble control or NDUFA4L2 siRNA and then exposed to normoxic or hypoxic (1% O₂) conditions for 24 hr (C) or transfected with the empty or pCMV-NDUFA4L2 vector (D). Cell lysates were analyzed against NDUFA4, NDUFA4L2, and tubulin antibodies.

(E) Immunoblot analysis of MEFs WT and KO for NDUFA4L2 showing the total deficiency of NDUFA4L2 and the decrease of NDUFA4 under hypoxic (1% O₂) conditions for 24 hr. Tubulin was used as a loading control.

(F) Model showing the involvement of NDUFA4L2 induction by HIF-1α in hypoxic adaptation. HIF-1α stabilization by hypoxia upregulates NDUFA4L2, which inhibits ETC Complex I activity. As a result, oxygen consumption decreases and ROS production is abrogated, thereby allowing cells to adapt to the hypoxic conditions. In contrast, hypoxia decreases NDUFA4 protein levels ($n > 3$; mean \pm SEM; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$).

express a large number of genes, dependent on HIFs, that reprogram the metabolism to attenuate mitochondrial O₂ consumption, which also protects cells against excessive mitochondrial ROS formation (Aragonés et al., 2009; Kim et al., 2006; Papanreou et al., 2006).

At the molecular level, we show here that moderate hypoxia decreases oxygen consumption and Complex I activity via the HIF-1-dependent upregulation of NDUFA4L2. Our data indicate that *NDUFA4L2* is a HIF-1-dependent gene, emphasizing the role of HIF-1 in mitochondrial reprogramming and revealing NDUFA4L2 as an important element in metabolic adaptation to hypoxia. We have observed this induction in different cell types, as well as in tissue from animals subjected to hypoxia, suggesting a role in physiological adaptation to hypoxia. In this regard, NDUFA4L2 KO homozygous mice, which could be a presumed mouse model of Complex I gain of function based on our own data, show perinatal lethality, stressing the high relevance of this protein in vivo. Similarly, mouse models of Complex I deficiency (Kruse et al., 2008) also die shortly after birth, which indicates that Complex I activity needs to be tightly controlled to assure an adequate development early after birth.

The PHD oxygen-sensing pathway is also known to upregulate the PDH kinase isoforms PDK1, PDK3, and PDK4 (Aragonés et al., 2008; Kim et al., 2006; Lu et al., 2008; Papanreou et al., 2006). PDK overactivation reduces PDH activity, slowing down the conversion of pyruvate into acetyl-CoA and ultimately repressing the TCA cycle and the supply of NADH to the mitochondrial ETC. Therefore, PDKs could potentially cooperate with NDUFA4L2 to reduce mitochondrial Complex I activity under moderate hypoxic conditions, but it is also conceivable that NDUFA4L2 has other biological functions that cannot be accom-

plished by PDKs. For example, when metabolites that fuel the TCA cycle originate from pathways different from glycolysis (e.g., glutaminolysis or fatty acid oxidation), it would be necessary to reduce ETC activity in order to decrease mitochondrial function (Wheaton and Chandel, 2011). Hypoxia-induced NDUFA4L2 expression could fulfill this role, reducing oxygen consumption due to its strategic position downstream of the TCA cycle, possibly at Complex I (Figure 7F). Likewise, hypoxia induces the upregulation of microRNA-210, which represses ISCU1/2 (Chan et al., 2009; Chen et al., 2010; Favaro et al., 2010). These proteins facilitate the assembly of iron-sulfur clusters, including those in Complex I, Complex III, and aconitase, which are critical for electron transport and mitochondrial redox reactions. As a result, microRNA-210 represses mitochondrial respiration. In our model, and in line with previous studies, ISCU1/2 protein does not decrease prior to 48 hr and only under 0.5% O₂, while NDUFA4L2 becomes functional as early as 24 hr at 1% O₂. Moreover, ISCU1/2 recovery in hypoxic HeLa cells did not disturb proliferation. In this sense, it has been described that an anti-miR-210 affects HeLa cell proliferation at times longer than 48 hr and at very low oxygen tensions (0.01% O₂) (Favaro et al., 2010).

Very intriguingly, however, Complex I inhibition in HeLa cells takes place at milder hypoxia (1% O₂) (Figure 4), and this oxygen tension does not seem to be enough to decrease ISCU1/2 (Figure S5A). Furthermore, ISCU1/2 downregulation is not observed before 48 hr, but Complex I is inhibited as early as 24 hr. This opened a 24 hr window during which NDUFA4L2 could be acting before ISCU induction takes place. As demonstrated, NDUFA4L2 Complex I inhibition occurs without affecting Complex I quantity, but probably by a direct or indirect

interaction that remains to be elucidated. However, miRNA-210-targeted ISCU1/2 presumably fulfills its function by decreasing Complex I content. This early NDUFA4L2-dependent qualitative modulation followed by a later miR210-dependent quantitative repression of Complex I represents a possible model by which HIF-1 guarantees a fine control of Complex I under hypoxic conditions. In summary, we propose that, although NDUFA4L2 upregulation and miR-210-induced ISCU1/2 repression could act synergistically to decrease Complex I activity and oxygen consumption in chronic hypoxia, we should underscore that primary (1% O₂) Complex I inhibition can be only accomplished by early NDUFA4L2 induction.

Altered subunit content during hypoxia has also been reported for other ETC complexes. Thus, physiological hypoxia induces a COX4-1 to COX4-2 subunit switch, an effect mediated by HIF-1 that is thought to optimize the efficiency of respiration during conditions of reduced oxygen availability (Fukuda et al., 2007). Since we have found that NDUFA4 is downregulated at the protein level in hypoxia, we could speculate that NDUFA4L2 induction is taking over NDUFA4's place at Complex I and reducing in some way its activity. However, NDUFA4L2 KO MEFs markedly repress NDUFA4 protein levels in hypoxia, while Complex I activity is not affected, ruling out the possibility that Complex I activity is repressed in hypoxia via NDUFA4. In this regard, the role and location of NDUFA4 within Complex I are not yet well understood.

The ETC produces superoxide when single electrons are transferred to O₂ during electron transport. There are different sites of ROS production in mammalian mitochondria (Murphy, 2009), but the greatest maximum capacity of ROS production is the ubiquinone reduction site of Complex I and the outer quinone-binding site of the Q cycle in Complex III (Liu et al., 2002; Raha and Robinson, 2000; St-Pierre et al., 2002; Votyakova and Reynolds, 2001). Although superoxide production in isolated mitochondria correlates with oxygen tension (Liu et al., 2002), it is generally accepted that ROS production in cells increases during short periods of hypoxia (Brunelle et al., 2005; Guzy et al., 2005; Mansfield et al., 2005). In agreement with this, we detected increased ROS in hypoxia using the fluorescent probes DCFDA and MitoSOX. The hypoxia-induced ROS increase was exacerbated in the absence of NDUFA4L2, indicating that the expression of this protein keeps ROS production under control and hence could protect the cell against oxidative stress. Whether the effects of NDUFA4L2 on ROS production are direct or occur through the modulation of other mitochondrial proteins requires further research. However, the fact that mitochondrial membrane potential increases simultaneously with increased ROS in the absence of NDUFA4L2 suggests that both events might be closely associated, as has been demonstrated elsewhere (Korshunov et al., 1997; Votyakova and Reynolds, 2001).

Hypoxia-exposed cell cultures accumulate intracellular ROS, but most probably at lower sublethal concentrations. As shown in Figure 5, and in line with previous studies, hypoxia slows down proliferation (Gardner et al., 2001; Goda et al., 2003). However, NDUFA4L2-silenced cells and MEFs from NDUFA4L2 KO mice showed a more profound inhibition of cell proliferation in parallel to a higher ROS accumulation and DNA stress/damage (H2AX phosphorylation) than control cells or MEFs

from wild-type mice. NDUFA4L2-silenced cells did not show signs of cellular apoptosis, probably because of the high-resistance nature of these tumor cells. Therefore, it is reasonable to think that the PHD-HIF system counteracts ROS overproduction that impairs cell growth.

Several *in vivo* and *in vitro* studies have revealed that the reduction of mitochondrial oxygen consumption through PHD and HIF activities prepares cells to tolerate more extreme lethal hypoxic/ischemic conditions, saving oxygen and reducing mitochondrial ROS formation. We hypothesize that NDUFA4L2 induction during hypoxia helps keep intracellular ROS production in check, consistent with the fact that NDUFA4L2 limits Complex I activity and prevents increases in membrane potential. It is therefore reasonable to speculate that NDUFA4L2 could participate in ischemic preconditioning. Indeed, several *in vivo* studies have shown that partial inhibition of Complex I with sublethal doses of amobarbital (a reversible inhibitor at the rotenone site of Complex I) prevents reperfusion-induced cardiac damage (Aldakkak et al., 2008; Chen et al., 2006a, 2006b).

Our studies indicate that mitochondrial Complex I activity is controlled by NDUFA4L2 during hypoxia. In conjunction with previous data on PHD- and HIF-regulated mitochondrial activity, we add further elements to the strategic armory used by HIFs to ensure that mitochondrial oxygen consumption is repressed in mild hypoxic conditions, highlighting the biological relevance of the regulation of this cellular response.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Lines and Cultures

HeLa, RCC4, RCC4/VHL, PC-12, HL-1, neonatal rat cardiomyocytes, Hif-1 $\alpha^{+/+}$ /Cre or Hif-1 $\alpha^{+/-}$ /Cre MEFs, and human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were used. See Supplemental Experimental Procedures for details.

Microarray Analysis

Total RNA was extracted using Ultraspec reagent (Biotecx, Houston, TX). One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis Protocol (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) was used to amplify and label RNA. Briefly, 200–700 ng of total RNA was reverse transcribed using T7 promoter Primer and MMLV-RT. Then cDNA was converted to aRNA using T7 RNA polymerase, which simultaneously amplifies target material and incorporates cyanine 3-labeled CTP. Samples were hybridized to Whole Human Genome Microarray 4 × 44K (G4112F, Agilent Technologies). Cy3-labeled aRNA (1.65 g) was hybridized for 17 hr at 65°C in a hybridization oven (G2545A, Agilent) set to 10 rpm in a final concentration of 1× GEx Hybridization Buffer HI-RPM, according to manufacturer's instructions (One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis, Agilent Technologies). Arrays were washed according to manufacturer's instructions (One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis, Agilent Technologies) and dried out using a centrifuge. Finally, arrays were scanned at 5 μm resolution on an Agilent DNA Microarray Scanner (G2565BA, Agilent Technologies) using the default settings for 4 × 44K format one-color arrays. Images provided by the scanner were analyzed using Feature Extraction software version 9.5.3.1 (Agilent Technologies).

In Vivo Hypoxia Experiments

Eight-week-old male C57BL/6 mice were exposed to hypoxic (7.5% O₂) or normoxic (21% O₂) conditions for 18 hr. After treatment mice were sacrificed under the same conditions to avoid tissue reoxygenation following hypoxia. The brain and heart were then excised, frozen in liquid nitrogen, and stored at –80°C. Organs were homogenized in liquid nitrogen and resuspended in RIPA buffer (1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, and 0.1% SDS in PBS buffer) for protein extraction or Ultraspec reagent (Biotecx, Houston, TX) for mRNA isolation.

Oxygen Consumption

Oxygen consumption was determined by high-resolution respirometry (Oxygraph-2k, Oroboros Instruments, Innsbruck, Austria). Cells were trypsinized after the indicated treatments and then resuspended at 2×10^6 cells/ml in HBSS containing 25 mM HEPES. The instrumental background flux was calculated as a linear function of the oxygen concentration, and the experimental data were corrected using DatLab software (Oroboros Instruments). The oxygen concentration in air-saturated culture medium at 37°C was 175.7 μ M (Rodríguez-Juárez et al., 2007). Measurements were taken at 37°C in parallel Oxygraph-2k chambers for cells incubated in normoxic and hypoxic (1% O₂) conditions with the indicated treatments.

Mitochondria Isolation

The isolation of an enriched mitochondrial fraction from $2\text{--}5 \times 10^7$ HeLa cells was performed using the Mitochondria Isolation Kit MitoISO2 (Sigma) according to the manufacturer's instructions.

Complex I and IV Activity

The activities of Complex I and Complex IV were measured using the Complex I Enzyme Activity Microplate Assay Kit or the Complex IV Human Duplexing Microplate Assay Kit, both from MitoSciences, according to the manufacturer's instructions.

Mitochondrial Membrane Potential

Mitochondrial membrane potential was determined by incubating the cells with the fluorescent dye tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE; Sigma). Cells were incubated with 2.5 nM TMRE for 30 min at 37°C and subsequently analyzed by FACScan flow cytometer (Becton Dickinson, Lincoln Park, NJ).

Cell Proliferation and Apoptosis

For the cell proliferation assay, 2×10^5 HeLa, HUVEC, UCD-mel-N, and SKOV3 cells were planted in a 10 cm dish 1 day before exposure to hypoxic conditions (0.5% O₂). Either 0.1 mM NAC or 0.5 μ M Mito-Q (0.5 μ M DTPP was used as control of Mito-Q) was added to HeLa cells to determinate the effect of the antioxidants on NDUFA4L2-interfered cell proliferation in hypoxia. At the times indicated, the cells were trypsinized and the viable cells were counted using trypan blue. Apoptosis was determined by flow cytometry analysis of the cell cycle after DNA staining with propidium iodide (PI) and by analysis of cleaved caspase-3 with a specific antibody (Cell Signaling). Positive controls for apoptosis were performed by incubating HeLa cells with taxol (Calbiochem) at 1 μ g/ml for 18 hr.

Soft Agar Assay

HeLa cells were seeded into 0.35% agar Noble (Difco) in DMEM containing 10% heat-inactivated FBS on top of a bed of 0.5% agar in 60 mm dishes at 5×10^3 cells per dish. Immobilized cells were grown for 15 days in a humidified chamber at 37°C and exposed to normoxic or hypoxic conditions (0.5% O₂). Colonies were then photographed using a DS-Fi1 camera (Nikon) and counted and measured using ImageJ software.

Analysis of ETC Complexes by Blue Native Electrophoresis Gel

Mitochondrial membrane proteins (100–150 mg) were applied and run on a 3%–13% first-dimension gradient Blue native electrophoresis gel as described elsewhere (Schägger, 1995). After electrophoresis, the complexes were electroblotted onto PVDF filters and sequentially probed with the following specific antibodies: anti-NDUFA9 (complex I), anti-core2 (complex III), anti-COI (complex IV), and anti-70 kDa subunit (complex II). All antibodies were obtained from Molecular Probes.

Ndufa4l2 Gene Inactivation in Mice

NDUFA4L2 chimeric males were obtained from Velocigene Regeneron Pharmaceuticals, Inc. (Reference number: 13661) through the KOMP repository. These chimeric mice were crossed with wild-type C57BL/6 females to generate NDUFA4L2 heterozygous mice. NDUFA4L2 heterozygous mice were used to generate NDUFA4L2-deficient embryos and the subsequent murine embryonic fibroblast isolation. The mice were bred and housed in a specific pathogen free (SPF) animal area of the animal facility at the Universidad Autónoma de Madrid (UAM).

Statistical Analysis

The data are presented as the means \pm SEM of at least three independent experiments. Statistical significance * $p < 0.05$ or ** $p < 0.01$ was assessed by the Wilcoxon test.

ACCESSION NUMBERS

The microarray data of HeLa cells are deposited at GEO DataSets with the accession number GSE33521.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes five figures, five tables, Supplemental Experimental Procedures, and Supplemental References and can be found with this article online at [doi:10.1016/j.cmet.2011.10.008](https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.10.008).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Ministerio de Ciencia e Innovación (SAF 2007-06592, SAF 2010-14851), Comunidad Autónoma de Madrid (SAL 2006/0311), Metoxia Project-Health (F2 2009-222741), and Recava Network (RD 06/0014/0031) to M.O.L.; PS09/00101 and CP07/00143 to A.M.-R.; PI060701, PS09/00116, and CP08/00204 to S.C.; BFU2008-03407/BMC to J.A.; SAF2009-08007 to J.A.E.; and CSD2007-00020 to A.M.-R. and J.A.E. The CNIC is supported by the Instituto de Salud Carlos III-MICINN and the Pro-CNIC Foundation. We are grateful to Mike Murphy (Mitochondrial Biology Unit, MRC, Cambridge, UK) for the gift of MitoQ. We also thank Stephen Y. Chan and Joseph Loscalzo (Harvard Medical School, Boston, MA) for providing us ISCU expression vectors.

Received: April 12, 2010

Revised: July 21, 2011

Accepted: October 7, 2011

Published online: November 17, 2011

REFERENCES

- Aguirre, E., Rodríguez-Juárez, F., Bellelli, A., Gnaiger, E., and Cadenas, S. (2010). Kinetic model of the inhibition of respiration by endogenous nitric oxide in intact cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1797, 557–565.
- Aldakkak, M., Stowe, D.F., Chen, Q., Lesnefsky, E.J., and Camara, A.K. (2008). Inhibited mitochondrial respiration by amobarbital during cardiac ischaemia improves redox state and reduces matrix Ca²⁺ overload and ROS release. *Cardiovasc. Res.* 77, 406–415.
- Andreas, K., Häupl, T., Lübke, C., Ringe, J., Morawietz, L., Wachtel, A., Sittlinger, M., and Kaps, C. (2009). Antirheumatic drug response signatures in human chondrocytes: potential molecular targets to stimulate cartilage regeneration. *Arthritis Res. Ther.* 11, R15.
- Aragonés, J., Schneider, M., Van Geyte, K., Fraisl, P., Dresselaers, T., Mazzone, M., Dirx, R., Zacchigna, S., Lemieux, H., Jeoung, N.H., et al. (2008). Deficiency or inhibition of oxygen sensor Phd1 induces hypoxia tolerance by reprogramming basal metabolism. *Nat. Genet.* 40, 170–180.
- Aragonés, J., Fraisl, P., Baes, M., and Carmeliet, P. (2009). Oxygen sensors at the crossroad of metabolism. *Cell Metab.* 9, 11–22.
- Brunelle, J.K., Bell, E.L., Quesada, N.M., Vercauteren, K., Tiranti, V., Zeviani, M., Scarpulla, R.C., and Chandel, N.S. (2005). Oxygen sensing requires mitochondrial ROS but not oxidative phosphorylation. *Cell Metab.* 1, 409–414.
- Carroll, J., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., Shannon, R.J., Hirst, J., and Walker, J.E. (2006). Bovine complex I is a complex of 45 different subunits. *J. Biol. Chem.* 281, 32724–32727.
- Chan, S.Y., Zhang, Y.Y., Hemann, C., Mahoney, C.E., Zweier, J.L., and Loscalzo, J. (2009). MicroRNA-210 controls mitochondrial metabolism during hypoxia by repressing the iron-sulfur cluster assembly proteins ISCU1/2. *Cell Metab.* 10, 273–284.

- Chen, Q., Hoppel, C.L., and Lesnefsky, E.J. (2006a). Blockade of electron transport before cardiac ischemia with the reversible inhibitor amobarbital protects rat heart mitochondria. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 316, 200–207.
- Chen, Q., Moghaddas, S., Hoppel, C.L., and Lesnefsky, E.J. (2006b). Reversible blockade of electron transport during ischemia protects mitochondria and decreases myocardial injury following reperfusion. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319, 1405–1412.
- Chen, Z., Li, Y., Zhang, H., Huang, P., and Luthra, R. (2010). Hypoxia-regulated microRNA-210 modulates mitochondrial function and decreases ISCU and COX10 expression. *Oncogene* 29, 4362–4368.
- Driessens, N., Versteijhe, S., Ghaddab, C., Burniat, A., De Deken, X., Van Sande, J., Dumont, J.E., Miot, F., and Corvilain, B. (2009). Hydrogen peroxide induces DNA single- and double-strand breaks in thyroid cells and is therefore a potential mutagen for this organ. *Endocr. Relat. Cancer* 16, 845–856.
- Favaro, E., Ramachandran, A., McCormick, R., Gee, H., Blancher, C., Crosby, M., Devlin, C., Blick, C., Buffa, F., Li, J.L., et al. (2010). MicroRNA-210 regulates mitochondrial free radical response to hypoxia and krebs cycle in cancer cells by targeting iron sulfur cluster protein ISCU. *PLoS ONE* 5, e10345.
- Favier, J., Brière, J.J., Burnichon, N., Riviére, J., Vescovo, L., Benit, P., Giscos-Douriez, I., De Reyniès, A., Bertherat, J., Badoual, C., et al. (2009). The Warburg effect is genetically determined in inherited pheochromocytomas. *PLoS ONE* 4, e7094.
- Fredlund, E., Ovenberger, M., Borg, K., and Pålman, S. (2008). Transcriptional adaptation of neuroblastoma cells to hypoxia. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 366, 1054–1060.
- Frost, M.T., Wang, Q., Moncada, S., and Singer, M. (2005). Hypoxia accelerates nitric oxide-dependent inhibition of mitochondrial complex I in activated macrophages. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 288, R394–R400.
- Fukuda, R., Zhang, H., Kim, J.W., Shimoda, L., Dang, C.V., and Semenza, G.L. (2007). HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell* 129, 111–122.
- Gardner, L.B., Li, Q., Park, M.S., Flanagan, W.M., Semenza, G.L., and Dang, C.V. (2001). Hypoxia inhibits G1/S transition through regulation of p27 expression. *J. Biol. Chem.* 276, 7919–7926.
- Gnaiger, E., Lassnig, B., Kuznetsov, A.V., and Margreiter, R. (1998). Mitochondrial respiration in the low oxygen environment of the cell. Effect of ADP on oxygen kinetics. *Biochim. Biophys. Acta* 1365, 249–254.
- Goda, N., Ryan, H.E., Khadivi, B., McNulty, W., Rickert, R.C., and Johnson, R.S. (2003). Hypoxia-inducible factor 1 α is essential for cell cycle arrest during hypoxia. *Mol. Cell. Biol.* 23, 359–369.
- Guzy, R.D., Hoyos, B., Robin, E., Chen, H., Liu, L., Mansfield, K.D., Simon, M.C., Hammerling, U., and Schumacker, P.T. (2005). Mitochondrial complex III is required for hypoxia-induced ROS production and cellular oxygen sensing. *Cell Metab.* 1, 401–408.
- Iyer, N.V., Kotch, L.E., Agani, F., Leung, S.W., Laughner, E., Wenger, R.H., Gassmann, M., Gearhart, J.D., Lawler, A.M., Yu, A.Y., and Semenza, G.L. (1998). Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 α . *Genes Dev.* 12, 149–162.
- Kaelin, W.G., Jr., and Ratcliffe, P.J. (2008). Oxygen sensing by metazoans: the central role of the HIF hydroxylase pathway. *Mol. Cell* 30, 393–402.
- Kim, J.W., Tchernyshyov, I., Semenza, G.L., and Dang, C.V. (2006). HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia. *Cell Metab.* 3, 177–185.
- Korshunov, S.S., Skulachev, V.P., and Starkov, A.A. (1997). High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* 416, 15–18.
- Kruse, S.E., Watt, W.C., Marcinek, D.J., Kapur, R.P., Schenkman, K.A., and Palmiter, R.D. (2008). Mice with mitochondrial complex I deficiency develop a fatal encephalomyopathy. *Cell Metab.* 7, 312–320.
- Liu, Y., Fiskum, G., and Schubert, D. (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J. Neurochem.* 80, 780–787.
- Lu, C.W., Lin, S.C., Chen, K.F., Lai, Y.Y., and Tsai, S.J. (2008). Induction of pyruvate dehydrogenase kinase-3 by hypoxia-inducible factor-1 promotes metabolic switch and drug resistance. *J. Biol. Chem.* 283, 28106–28114.
- Mansfield, K.D., Guzy, R.D., Pan, Y., Young, R.M., Cash, T.P., Schumacker, P.T., and Simon, M.C. (2005). Mitochondrial dysfunction resulting from loss of cytochrome c impairs cellular oxygen sensing and hypoxic HIF- α activation. *Cell Metab.* 1, 393–399.
- Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417, 1–13.
- Papandreou, I., Cairns, R.A., Fontana, L., Lim, A.L., and Denko, N.C. (2006). HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.* 3, 187–197.
- Piruat, J.I., and López-Barneo, J. (2005). Oxygen tension regulates mitochondrial DNA-encoded complex I gene expression. *J. Biol. Chem.* 280, 42676–42684.
- Raha, S., and Robinson, B.H. (2000). Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem. Sci.* 25, 502–508.
- Rodríguez-Juárez, F., Aguirre, E., and Cadenas, S. (2007). Relative sensitivity of soluble guanylate cyclase and mitochondrial respiration to endogenous nitric oxide at physiological oxygen concentration. *Biochem. J.* 405, 223–231.
- Schägger, H. (1995). Native electrophoresis for isolation of mitochondrial oxidative phosphorylation protein complexes. *Methods Enzymol.* 260, 190–202.
- Schofield, C.J., and Ratcliffe, P.J. (2004). Oxygen sensing by HIF hydroxylases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 343–354.
- Semenza, G.L. (2004). Hydroxylation of HIF-1: oxygen sensing at the molecular level. *Physiology (Bethesda)* 19, 176–182.
- Semenza, G.L. (2009). Regulation of oxygen homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Physiology (Bethesda)* 24, 97–106.
- Smolenski, R.T., Schrader, J., de Groot, H., and Deussen, A. (1991). Oxygen partial pressure and free intracellular adenosine of isolated cardiomyocytes. *Am. J. Physiol.* 260, C708–C714.
- St-Pierre, J., Buckingham, J.A., Roeback, S.J., and Brand, M.D. (2002). Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *J. Biol. Chem.* 277, 44784–44790.
- Stumpe, T., and Schrader, J. (1997). Phosphorylation potential, adenosine formation, and critical PO₂ in stimulated rat cardiomyocytes. *Am. J. Physiol.* 273, H756–H766.
- Vogel, R.O., Janssen, R.J., Ugalde, C., Grovenstein, M., Huijbens, R.J., Visch, H.J., van den Heuvel, L.P., Willems, P.H., Zeviani, M., Smeitink, J.A., and Nijtmans, L.G. (2005). Human mitochondrial complex I assembly is mediated by NDUFAF1. *FEBS J.* 272, 5317–5326.
- Votyakova, T.V., and Reynolds, I.J. (2001). DeltaPsi(m)-Dependent and -independent production of reactive oxygen species by rat brain mitochondria. *J. Neurochem.* 79, 266–277.
- Walker, J.E., Arizmendi, J.M., Dupuis, A., Fearnley, I.M., Finel, M., Medd, S.M., Pilkington, S.J., Runswick, M.J., and Skehel, J.M. (1992). Sequences of 20 subunits of NADH:ubiquinone oxidoreductase from bovine heart mitochondria. Application of a novel strategy for sequencing proteins using the polymerase chain reaction. *J. Mol. Biol.* 226, 1051–1072.
- Wheaton, W.W., and Chandel, N.S. (2011). Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 300, C385–C393.

HIF2 α Acts as an mTORC1 Activator through the Amino Acid Carrier SLC7A5

Ainara Elorza,^{1,7} Inés Soro-Arnáiz,^{1,7} Florinda Meléndez-Rodríguez,¹ Victoria Rodríguez-Vaello,¹ Glenn Marsboom,¹ Guillermo de Cárcer,³ Bárbara Acosta-Iborra,¹ Lucas Albacete-Albacete,¹ Angel Ordóñez,¹ Leticia Serrano-Oviedo,⁵ Jose Miguel Giménez-Bachs,⁶ Alicia Vara-Vega,² Antonio Salinas,⁶ Ricardo Sánchez-Prieto,⁵ Rafael Martín del Río,⁴ Francisco Sánchez-Madrid,² Marcos Malumbres,³ Manuel O. Landázuri,¹ and Julián Aragonés^{1,*}

¹Research Unit, Hospital Universitario Santa Cristina, Research Institute Princesa, Autonomous University of Madrid, 28009 Madrid, Spain

²Immunology Department, Hospital Universitario de La Princesa, Research Institute Princesa, Autonomous University of Madrid, 28006 Madrid, Spain

³Cell Division and Cancer Group, Spanish National Cancer Research Centre (CNIO), E-28029 Madrid, Spain

⁴Departamento de Investigación, Hospital Universitario Ramón y Cajal, 28034 Madrid, Spain

⁵Laboratorio de Oncología Molecular, Centro Regional de Investigaciones Biomédicas, Parque Científico y Tecnológico de Castilla-La Mancha (PCYTA)/Universidad de Castilla-La Mancha (UCLM), 02008 Albacete, Spain

⁶Servicio de Urología, Complejo Hospitalario Universitario de Albacete, Facultad de Medicina de la UCLM, 02006 Albacete, Spain

⁷These authors contributed equally to this work

*Correspondence: jaragones.hlpr@salud.madrid.org

<http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.017>

SUMMARY

The mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway, which is essential for cell proliferation, is repressed in certain cell types in hypoxia. However, hypoxia-inducible factor 2 α (HIF2 α) can act as a proliferation-promoting factor in some biological settings. This paradoxical situation led us to study whether HIF2 α has a specific effect on mTORC1 regulation. Here we show that activation of the HIF2 α pathway increases mTORC1 activity by upregulating expression of the amino acid carrier SLC7A5. At the molecular level we also show that HIF2 α binds to the *Slc7a5* proximal promoter. Our findings identify a link between the oxygen-sensing HIF2 α pathway and mTORC1 regulation, revealing the molecular basis of the tumor-promoting properties of HIF2 α in von Hippel-Lindau-deficient cells. We also describe relevant physiological scenarios, including those that occur in liver and lung tissue, wherein HIF2 α or low-oxygen tension drive mTORC1 activity and SLC7A5 expression.

INTRODUCTION

Cells are equipped with oxygen-sensing systems for mounting an adaptive-programmed response in situations wherein oxygen availability is limited. Hypoxia-inducible factors (HIF1, HIF2, and HIF3) are central regulators of this cellular response. Indeed, when oxygen is available, prolyl hydroxylases (PHD-1, PHD-2, and PHD-3) act as O₂ sensors, using O₂ to hydroxylate critical prolyl residues in HIF α subunits (Bruick and McKnight, 2001; Epstein et al., 2001; Wang et al., 1995). Upon hydroxylation by PHDs, these HIF α subunits are recognized by the von Hippel-Lindau (VHL) factor, a component in the multiprotein E3 ubiquitin

ligase complex, which marks them for subsequent degradation by the proteasome machinery (Ivan et al., 2001; Jaakkola et al., 2001). In conditions of hypoxia, PHDs do not have enough O₂ to hydroxylate these prolyl residues, thereby stabilizing the HIF α subunits and activating the HIF-dependent transcriptional program.

The mammalian target of rapamycin (mTOR) is a serine-threonine kinase that senses and integrates signals from extracellular stimuli. By responding to oxygen and amino acid availability and energy status of the cell, mTOR plays a central role in cell growth and proliferation (Schmelzle and Hall, 2000; Sonenberg and Hinnebusch, 2009). The mTORC1 complex mediates the phosphorylation of 4EBP1 (eukaryotic initiation factor 4E-binding protein) and p70-S6K (ribosomal protein 6 kinase), and these two axes of the mTORC1 pathway are essential regulators of protein translation (Hara et al., 2002; Kim et al., 2002; Sonenberg and Hinnebusch, 2009). Phosphorylation of 4EBP1 by mTORC1 prevents its interaction with eIF4E, allowing assembly of the eIF4 complex and thereby promoting 5'-cap-mRNA translation (Sonenberg and Hinnebusch, 2009). Phosphorylation of p70-S6K by mTORC1 drives phosphorylation of its target, the ribosomal protein S6 (rpS6), an integral component of the 40S subunit of the ribosome (Ma and Blenis, 2009; Sonenberg and Hinnebusch, 2009). The activity of mTORC1 is usually inhibited when oxygen availability is limited, a mechanism thought to save ATP by limiting energy-consuming events such as protein translation. Such hypoxia-induced mTORC1 repression is mediated by HIF-driven gene expression of *Redd1* (Brugarolas et al., 2004; Cam et al., 2010; DeYoung et al., 2008; Wolff et al., 2011). Indeed, mTORC1 is inhibited by the GTPase-activating protein tuberous sclerosis complex (TSC1-TSC2) (Kwiatkowski, 2003; Li et al., 2004; Ma and Blenis, 2009; Manning and Cantley, 2003), and it is proposed that REDD1 directly binds to and sequesters 14-3-3 proteins from TSC2, resulting in TSC activation and subsequent mTORC1 inhibition (DeYoung et al., 2008). Another HIF1-dependent gene, *bNIP3*, has also been implicated in hypoxia-dependent mTORC1 inhibition, because

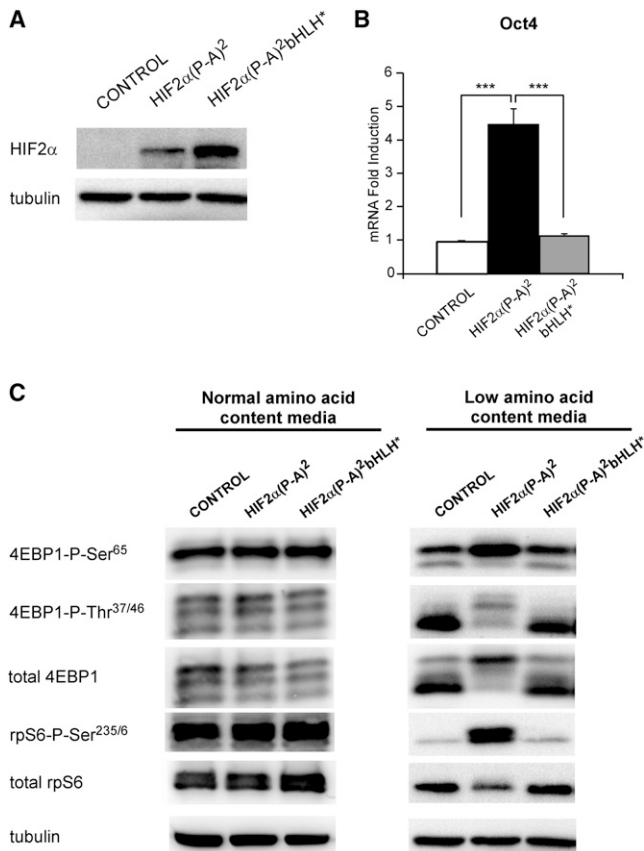


Figure 1. Effects of HIF2 α Activity on mTORC1 Activation in WT8 Cells

(A) Western blot analysis of HIF2 α and tubulin protein in HIF2 α (P-A)², HIF2 α (P-A)²bHLH*, and WT8 control cells.

(B) Relative *Oct4* gene expression in HIF2 α (P-A)², HIF2 α (P-A)²bHLH*, and WT8 control cells. The mean is shown; error bars represent SEM (n = 6, ***p < 0.001).

(C) Cell lysates from control, HIF2 α (P-A)², and HIF2 α (P-A)²bHLH* WT8 cells cultured for 72 hr in normal culture media (left panel) or in media with 50% of the normal amino acid content (right panel) were analyzed by western blot with antibodies as shown.

See also Figure S1.

it decreases the activity of RHEB (Li et al., 2007), a small GTPase necessary for mTORC1 activity and negatively regulated by the TSC1-TSC2 complex (Kwiatkowski, 2003; Li et al., 2004; Ma and Blenis, 2009; Manning and Cantley, 2003). In addition to these HIF-dependent mechanisms, other essential HIF-independent pathways have been shown to drive mTORC1 repression during hypoxia, such as those involving AMP-activated protein kinase (AMPK) (Liu et al., 2006; Wolff et al., 2011).

HIF1 α attenuates cell proliferation (Carmeliet et al., 1998; Goda et al., 2003; Gordan et al., 2007; Koshiji et al., 2004), and this effect is partially mediated by this TSC-dependent mTORC1 inhibition (Liu et al., 2006) but also involves a HIF1 α -dependent repression of the proliferation-promoting transcription factor c-myc (Gordan et al., 2007; Koshiji et al., 2004). A recent study identified homozygous deletions of the *HIF1 α* locus in 14q in many clear cell renal cell carcinoma (CCRCC) cell lines, specifi-

cally identifying *HIF1 α* as a kidney cancer suppressor gene (Shen et al., 2011). However, recent studies of VHL-deficient cells that constitutively induce HIF isoforms in normoxic conditions have demonstrated the proliferation and tumor-promoting properties of the HIF2 α isoform (Gordan et al., 2007; Gordan et al., 2008; Kondo et al., 2003; Kondo et al., 2002; Raval et al., 2005). A study of human renal cell carcinoma samples also revealed that VHL-deficient carcinomas can be categorized as those expressing both isoforms HIF1 α and HIF2 α and those expressing HIF2 α alone after loss of HIF1 α (Gordan et al., 2007). Those exclusively expressing HIF2 α are larger in size and grow more rapidly, in agreement with the proliferative properties of the HIF2 α isoform (Gordan et al., 2007; Mandriota et al., 2002; Raval et al., 2005). Constitutive HIF2 α activation also induces signs of proliferation in vivo in other biological systems, such as in liver tissue (Kim et al., 2006). A recent study in renal cell carcinoma demonstrated that, in contrast to HIF1 α , HIF2 α regulates the expression of several c-myc-dependent genes, such as *p21* and *cyclinD2*, by promoting c-myc and Max heterodimerization independently of HIF2 α DNA binding activity (Gordan et al., 2007).

These proliferation-promoting properties of HIF2 α are difficult to reconcile with the aforementioned mTORC1 repression induced by HIF1 α and HIF-independent pathways. Here we show that activation of the HIF2 α pathway in VHL-deficient tumor cells increases mTORC1 activity by upregulating the expression of SLC7A5, an amino acid carrier critical for its activity. This HIF2 α -SLC7A5 molecular axis is essential for explaining the tumor-promoting properties of HIF2 α in VHL-deficient tumor cells. Moreover, we found that upon *Vhl* gene inactivation in mice, endogenous HIF2 α also drives both mTORC1 activation and SLC7A5 expression in other biological contexts in vivo. Importantly, we show that in lung tissue, both hypoxia and HIF2 α activation increase mTORC1 activity and SLC7A5 expression, describing a hypoxic scenario leading to mTORC1 activation rather than the repression found in some other hypoxic contexts. We have thus shown that HIF2 α increases mTORC1 activity in different biological systems, defining a link between the oxygen-sensing HIF2 α pathway and mTORC1 regulation.

RESULTS

The HIF2 α Pathway Induces mTORC1 Activity

To assess the role of HIF2 α in the regulation of mTORC1 activity, we used ectopically expressed active and inactive forms of HIF2 α in WT8 cells, a cellular model widely used for exploring the biological functions of HIF2 α in tumor cells derived from renal cell carcinomas (Kondo et al., 2003; Kondo et al., 2002; Raval et al., 2005). We generated transfectants in WT8 cells that expressed a transcriptionally active and stable form of HIF2 α (HIF2 α (P-A)²) or its corresponding DNA binding domain mutant (HIF2 α (P-A)²bHLH*) (see Supplemental Experimental Procedures available online). Both HIF2 α forms were efficiently expressed in HIF2 α (P-A)² WT8 and HIF2 α (P-A)²bHLH* WT8 cells compared with WT8 control cells (Figure 1A). *Oct4*, a well-recognized HIF2 α -dependent gene (Covello et al., 2006), was regulated as expected (Figure 1B). The activity of mTORC1 was

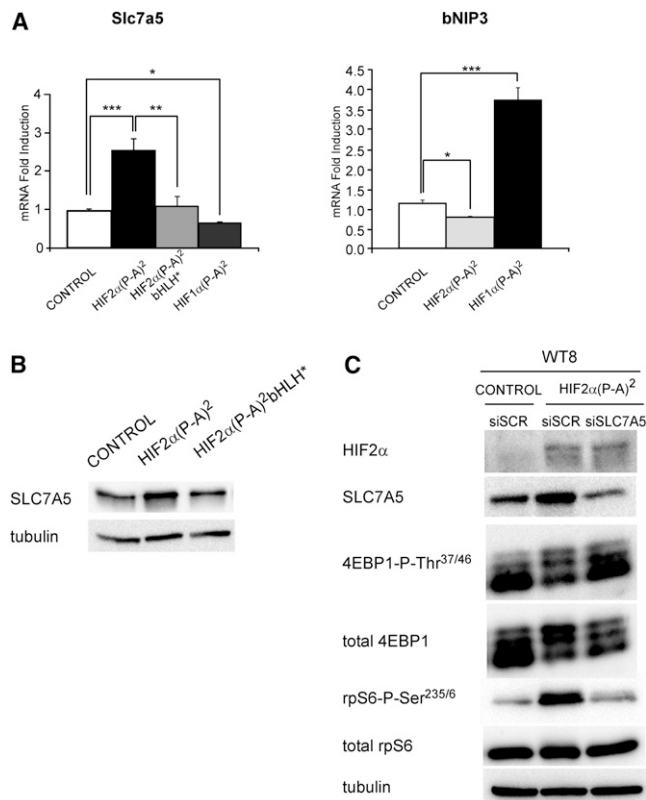


Figure 2. Contribution of SLC7A5 Expression to HIF2 α -Dependent mTORC1 Activation

(A) Left panel, relative *Slc7a5* gene expression in HIF2 α (P-A)², HIF2 α (P-A)²bHLH*, HIF1 α (P-A)², and WT8 cells. The mean is shown, and error bars represent SEM (n = 6, *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001). Right panel, relative *bNIP3* gene expression in HIF2 α (P-A)², HIF1 α (P-A)², and WT8 control cells (n = 4). The mean is shown; error bars represent SEM (n = 4, *p < 0.05, ***p < 0.001).

(B) Western blot analyses of SLC7A5 and tubulin protein levels in HIF2 α (P-A)², HIF2 α (P-A)²bHLH*, and WT8 control cells.

(C) WT8 control cells were transfected with scrambled control small interfering RNA (siSCR), and HIF2 α (P-A)² WT8 cells were transfected with either siSCR or siRNA against *Slc7a5* (siSLC7A5). The cells were subsequently cultured for 72 hr in media with 50% of the normal amino acid content. Whole-cell extracts were analyzed by western blot with antibodies indicated.

See also Figure S2.

then evaluated with two commonly used markers, the phosphorylated forms of 4EBP1 and rpS6 (Cam et al., 2010; Sonenberg and Hinnebusch, 2009). In normal culture media, the phosphorylation levels of 4EBP1 (assessed with antibodies for phospho-4EBP1^{Ser65} and phospho-4EBP1^{Thr37/46}) and rpS6 (assessed with an antibody for phospho-rpS6^{Ser235/6}) were similar in HIF2 α (P-A)² WT8, HIF2 α (P-A)²bHLH* WT8, and control WT8 cells (Figure 1C). We then investigated whether HIF2 α (P-A)² could induce mTORC1 activity in WT8 control cells when basal mTORC1 activity was decreased. As mTORC1 activity is dependent on extracellular amino acid concentration (Hara et al., 2002; Nicklin et al., 2009; Wang et al., 1998), we included an additional condition in these experiments: cells were cultured in media containing 50% of the normal amino acid concentration.

Assessment of total 4EBP1 protein under these limiting amino acid conditions revealed that the majority of 4EBP1 in WT8 control cells was present in the lower band, indicative of hypophosphorylation and 4EBP1 inactivation. By contrast, the majority of 4EBP1 was present in the upper band in HIF2 α (P-A)² WT8 cells, indicative of hyperphosphorylation and 4EBP1 activation. Moreover, anti-p4EBP1^{Ser65} revealed a more marked 4EBP1 phosphorylation of this Ser65 position in WT8 cells expressing HIF2 α (P-A)². These upper bands were also detected when the membranes were probed with a p4EBP1^{Thr37/46} antibody. This effect was entirely dependent on HIF2 α DNA-binding activity, as the phospho-4EBP1 levels in WT8 cells expressing HIF2 α (P-A)²bHLH* were similar to those of WT8 control cells (Figure 1C). Likewise, phospho-rpS6^{Ser235/6} levels were markedly higher in HIF2 α (P-A)² WT8 cells compared with control and HIF2 α (P-A)²bHLH* WT8 cells (Figure 1C). This effect was specifically driven by HIF2 α (P-A)², because mTORC1 activity was not induced in HIF1 α (P-A)² WT8 cells that express a constitutively active form of HIF1 α (Figure S1). Collectively, these data indicate that HIF2 α sustains mTORC1 activity when amino acid supply is a limiting factor.

SLC7A5, an Activator of mTORC1, Is Specifically Induced by HIF2 α

Based on these results, we investigated the molecular mechanisms linking HIF2 α activity with mTORC1 activation. The amino acid carriers SLC1A5 (ASCT2) and SLC7A5 (LAT1) are critical in sustaining mTORC1 activity (Fuchs and Bode, 2005; Nicklin et al., 2009). We investigated whether HIF2 α could alter the expression of these mTORC1 activators and found that *Slc7a5* gene expression was markedly induced in HIF2 α (P-A)² WT8 cells compared with either WT8 control cells or HIF2 α (P-A)²bHLH* WT8 cells (Figure 2A). By contrast, ASCT2 RNA levels were minimally affected in HIF2 α (P-A)² cells (data not shown). This effect was specifically driven by HIF2 α , because HIF1 α (P-A)² WT8 cells showed a modest inhibition of *Slc7a5* gene expression in parallel to the expected induction of *bNIP3* (Figure 2A), which is a well-recognized HIF1 α -dependent gene (Raval et al., 2005). Western blots also revealed an increase in SLC7A5 protein levels in HIF2 α (P-A)² WT8 cells (Figure 2B). To determine whether elevated SLC7A5 expression is responsible for HIF2 α -dependent mTORC1 activation, we next silenced *Slc7a5* gene expression in HIF2 α (P-A)² WT8 cells. This resulted in a marked repression of mTORC1 activity in HIF2 α (P-A)² WT8 cells to near-control levels in WT8 control cells (Figure 2C). Indeed, total 4EBP1 and p4EBP1^{Thr37/46} western blot analysis showed that *Slc7a5* gene silencing markedly increased the proportion of the lower 4EBP1 band, indicative of the hypophosphorylation and 4EBP1 inactivation (Figure 2C). Similarly, HIF2 α (P-A)² was much less efficient in promoting rpS6 hyperphosphorylation when *Slc7a5* gene expression was reduced (Figure 2C). This partial silencing of SLC7A5 expression did not inhibit mTORC1 when cells were cultured in media with normal amino acid content (Figure S2A). In line with the involvement of SLC7A5 on HIF2 α -dependent mTORC1 activity, HIF2 α (P-A)² WT8 cells also preserved mTORC1 activity when cultured in media with a specifically reduced content of essential amino acids and glutamine (data not shown), which are those amino

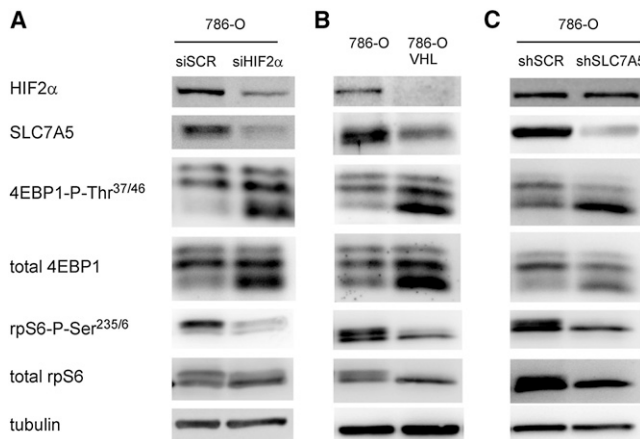


Figure 3. Effect of Endogenous HIF2 α on mTORC1 Activity and SLC7A5 Expression in 786-O VHL-Deficient Cells

Western blot analysis with antibodies as shown in (A) HIF2 α -silenced 786-O cells and their corresponding control siSCR-transfected 786-O cells 72 hr after transfection, (B) 786-O and their counterparts in which VHL expression was restored (786-O-VHL), and (C) SLC7A5-silenced 786-O cells and their corresponding control 786-O-shSCR cells. All these experiments were performed by culturing 786-O cells for 48 hr in media with 5% of the normal content of essential amino acids and glutamine.

acids more specifically involved in mTORC1 activity via SLC7A5 (Fuchs and Bode, 2005; Nicklin et al., 2009). Furthermore, silencing of RagA and RagB, previously identified as central mediators of essential-amino-acid-dependent mTORC1 activity (Kim et al., 2008; Sancak et al., 2008), also compromised mTORC1 activity in HIF2 α (P-A)² WT8 cells (Figure S2B). All these data suggest that below a certain threshold of extracellular amino acid content, HIF2 α -dependent SLC7A5 expression becomes a limiting factor for mTORC1 activity. This may reflect the fact that amino acid levels in normal culture media exceed those normally encountered by cells in vivo.

We next studied the role of endogenous HIF2 α on the mTORC1 pathway and SLC7A5 expression using the VHL-deficient renal cell carcinoma cell line 786-O, which constitutively expresses endogenous HIF2 α in normoxia (Kondo et al., 2002). Importantly, silencing of endogenous HIF2 α resulted in a marked repression of mTORC1 activity and SLC7A5 expression in 786-O VHL-deficient cells when cells were cultured specifically in media with reduced content of essential amino acids and glutamine (Figure 3A), but not in media with normal amino acid content (data not shown). Indeed, silencing of HIF2 α markedly increased the predominance of the lower 4EBP1 band, indicative of 4EBP1 inactivation, and also reduced rpS6 hyperphosphorylation levels (Figure 3A). Similar effects on mTORC1 activity and SLC7A5 expression were observed when HIF2 α was repressed by restoring VHL expression in 786-O cells (Figure 3B). To assess the relative contribution of the HIF2 α -dependent increase in SLC7A5 expression to mTORC1 activity in 786-O cells, we generated the 786-O-shSLC7A5 cell line, in which SLC7A5 expression was silenced to levels similar to those obtained after HIF2 α silencing (see Figures 3A and 3C). Importantly, the levels of phospho-rpS6 decreased markedly following SLC7A5 silencing compared with their corresponding control 786-O-

shSCR cells (Figure 3C). Moreover, 786-O-shSLC7A5 also showed a predominance of the lower 4EBP1 band, indicative of 4EBP1 inactivation, compared with 786-O-shSCR cells (Figure 3C). Collectively, these data indicate that endogenous HIF2 α expression in 786-O cells also regulates mTORC1 activity via SLC7A5 when the amino acid supply is limited.

HIF2 α Binds to the *Slc7a5* Proximal Promoter

The above results led us to explore whether SLC7A5 was a direct target of HIF2 α . We next investigated whether HIF2 α binds to the regulatory DNA sequences at the *Slc7a5* locus. Sequence analysis revealed that the human proximal promoter of *Slc7a5* contains two potential HIF binding sites at positions -112 and -458 (Figure 4A). Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assay with HIF2 α (P-A)² WT8, HIF2 α (P-A)²bHLH* WT8, and WT8 control cells showed that HIF2 α binding activity to the *Slc7a5* proximal promoter, but not to *Slc7a5* intron 1, was augmented in HIF2 α (P-A)² WT8 cells compared with HIF2 α (P-A)²bHLH* and WT8 control cells (Figure 4B). Moreover, constitutive binding of endogenous HIF2 α to the *Slc7a5* proximal promoter, but not to *Slc7a5* intron 1, was observed in 786-O control cells when compared with 786-O-VHL cells (Figure 4C). A parallel analysis under identical experimental conditions in HIF1 α (P-A)² WT8 cells revealed no binding of HIF1 α to the *Slc7a5* proximal promoter, whereas binding was observed to the promoter of pyruvate dehydrogenase kinase 1 (*Pdk1*), a well-recognized HIF1 α -responsive gene (Supplemental Experimental Procedures and Figure S3). Taken together, these findings indicate that HIF2 α specifically binds directly to the *Slc7a5* proximal promoter through its DNA binding domain, and it therefore contributes to *Slc7a5* gene expression.

HIF2 α Induces Renal Cell Carcinoma Cell Proliferation and Xenograft Growth via SLC7A5

HIF2 α expression in renal cell VHL-deficient carcinoma has been shown to accelerate tumor growth (Kondo et al., 2003; Kondo et al., 2002; Raval et al., 2005). Thus, we first investigated the contribution of the HIF2 α -SLC7A5 pathway to cell proliferation in HIF2 α (P-A)² WT8 cells. These cells did not proliferate more rapidly than WT8 control cells or HIF2 α (P-A)²bHLH* WT8 cells when cultured in media with normal amino acid content. Indeed, a trend toward decreased proliferation was observed, although this did not differ significantly compared with HIF2 α (P-A)²bHLH* WT8 cells (Figure 5A). Given the role of SLC7A5 as an amino acid carrier, we investigated whether HIF2 α can confer a proliferative advantage when cells are grown in conditions of limited amino acid availability. In media with 5% of the normal amino acid concentration, HIF2 α (P-A)² WT8 cells showed a higher proliferation rate than WT8 control cells or HIF2 α (P-A)²bHLH* WT8 cells (Figure 5A). Moreover, none of the cell lines analyzed exhibited signs of apoptosis in these conditions (data not shown), and proliferation was maintained, although at a lower rate than in normal amino acid media. Importantly, both silencing of *Slc7a5* gene expression and pharmacological inhibition of mTORC1 by rapamycin diminished the proliferative advantage of HIF2 α (P-A)² WT8 cells in media with low amino acid content (Figures 5B and 5C). This supports the role of the HIF2 α -SLC7A5-mTORC1 molecular axis in this

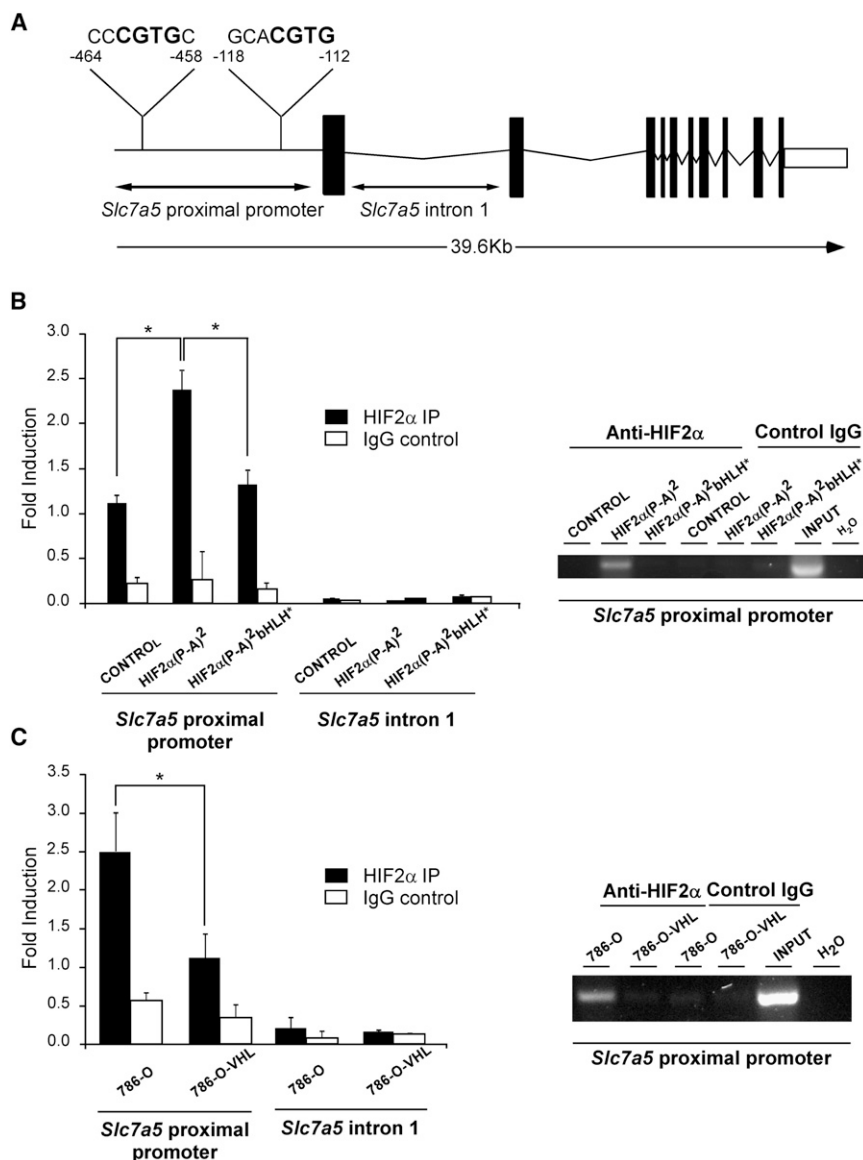


Figure 4. HIF2 α Binds to the *Slc7a5* Proximal Promoter

(A) Schematic representation of the human *Slc7a5* gene indicating the positions of the proximal promoter and intron 1 and the nucleotide sequences corresponding to the putative hypoxia-response elements highlighted in bold.

(B and C) ChIP assay to assess the relative HIF2 α binding activity to the human *Slc7a5* proximal promoter or intron 1 in (B) HIF2 α (P-A)², HIF2 α (P-A)²bHLH⁺, and WT8 control cells or (C) 786-O and their counterparts in which VHL expression was restored (786-O-VHL). Representative gel showing DNA amplified in the ChIP assays is shown. The mean is shown; error bars represent SEM (n = 5, *p < 0.05). IgG, immunoglobulin G. See also Figure S3.

SLC7A5 expression is critical for explaining the tumor-promoting properties of HIF2 α in 786-O cells when these cells encounter the intratumoral environment, presumably with a limited supply of amino acids (Marjon et al., 2004).

To pursue a possible clinical value for our data, we also investigated SLC7A5 expression in nephrectomy samples from patients with VHL-deficient CCRCCs or patients with non-clear cell renal cell carcinomas (NCRCCs). All CCRCCs (n = 5) showed elevated expression of carbonic anhydrase IX (Caix) (Figure S4), a previously identified HIF-dependent gene markedly elevated in CCRCCs as compared with healthy tissue (Mandriota et al., 2002; Raval et al., 2005). A parallel western blot analysis showed that total SLC7A5 signal, present as two bands, was increased in CCRCCs compared with healthy renal tissue and correlated with the CAIX signal

cell-autonomous proliferation advantage when amino acid supply is limited, a scenario thought to mimic the intratumoral environment during tumor growth (Marjon et al., 2004).

To address the role of the HIF2 α -SLC7A5 pathway in tumor growth in vivo, we used the 786-O cellular model that has been widely used for assessing the protumoral properties of HIF2 α in renal cell carcinoma (Kondo et al., 2003; Raval et al., 2005). For this purpose, we used 786-O-shSLC7A5 cells in which SLC7A5 expression was reduced to similar levels found upon HIF2 α silencing in 786-O cells (see Figures 3A and 3C). Importantly, the xenograft growth capability of 786-O-shSLC7A5 cells was markedly suppressed compared with 786-O-shScrambled control cells (Figure 5D). Indeed, after 45 days of subcutaneous injection, the 786-O-shSLC7A5 xenograft size (mm³) was markedly reduced (345.6 \pm 89 in 786-O-shScrambled xenografts versus 56.62 \pm 16 in 786-O-shSLC7A5 xenografts; n = 18; p = 0.0039). These findings indicate that HIF2 α -dependent

(Figure S4). These two bands were identified as SLC7A5 via probing with four different antibodies for SLC7A5 (data not shown). CCRCC sample #4 did not show induction of SLC7A5 expression, which is in line with a much weaker elevation of CAIX expression in this particular sample. Moreover, neither CAIX expression nor SLC7A5 western blot signal was markedly altered in NCRCCs analyzed (n = 3), as observed in CCRCCs (Figure S4). Taken together with the aforementioned xenograft data, these findings show the importance of the HIF2 α -SLC7A5 pathway in the CCRCC progression underlying the tumoral and proliferative properties of HIF2 α .

HIF2 α Regulates *Slc7a5* Gene Expression and mTORC1 Activity in Mice upon *Vhl* Gene Inactivation or Hypoxic Exposure In Vivo

We next explored whether the HIF2 α -mTORC1 activatory pathway is present in other biological scenarios. We reasoned

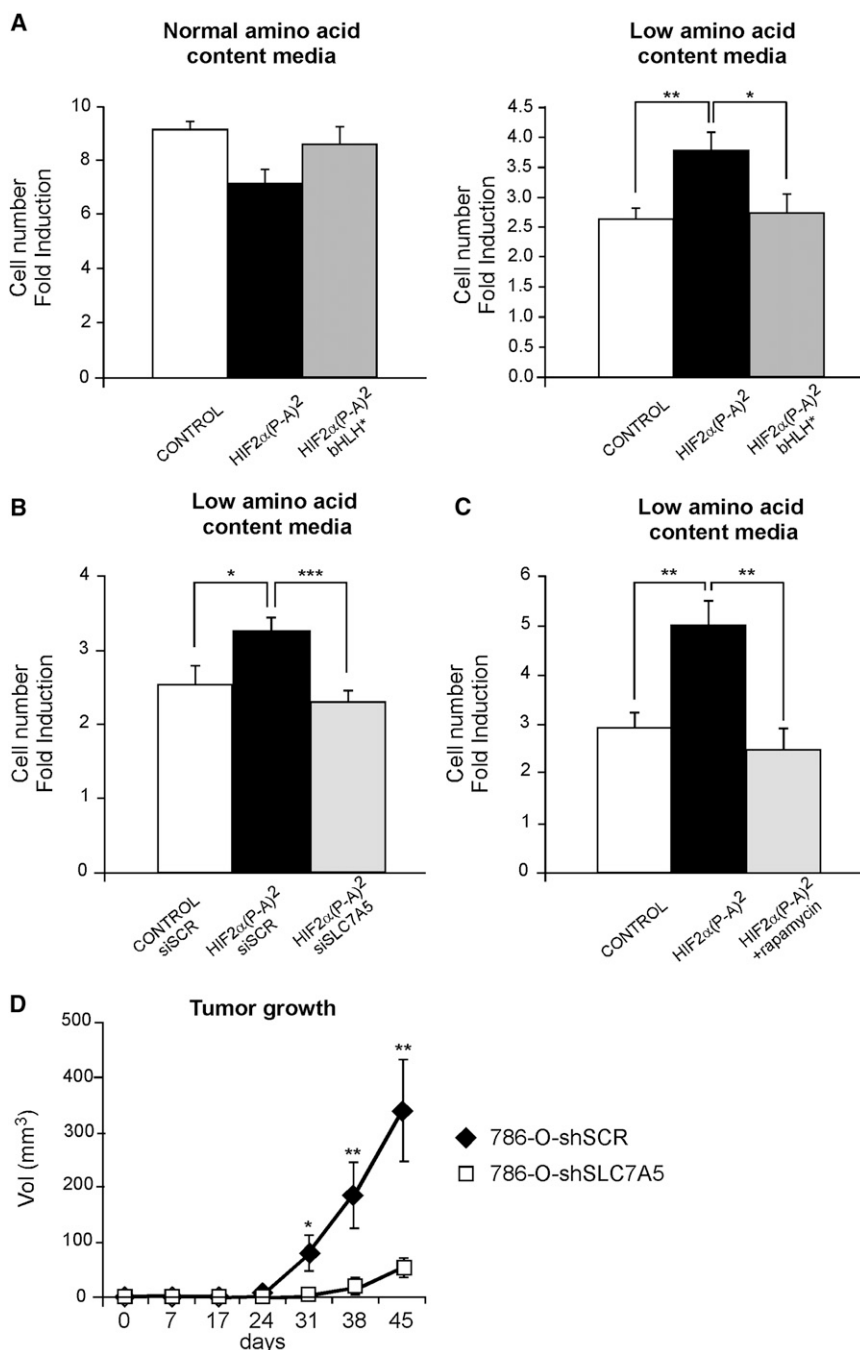


Figure 5. Role of the HIF2 α -Dependent SLC7A5 Pathway in Cell Proliferation and Xenograft Growth

(A) Cell number fold induction in control, HIF2 α (P-A)², and HIF2 α (P-A)²bHLH⁺ WT8 cells cultured for 72 hr in normal media (left panel) or in media containing 5% of the normal amino acid concentration (right panel). Statistical significance was indicated only when HIF2 α (P-A)² proliferation differed significantly from that of both HIF2 α (P-A)²bHLH⁺ WT8 and control WT8 cells. The mean is shown; error bars represent SEM (n = 4, *p < 0.05, **p < 0.01).

(B) WT8 control cells were transfected with scrambled control siRNA (siSCR), and HIF2 α (P-A)² WT8 cells were transfected with either siSCR or siRNA for *Slc7a5* (siSLC7A5). Twenty-four hours after transfection, cells were seeded at the same cell density in media containing 5% of the regular amino acid concentration, and the increase in cell number was analyzed after 72 hr. The mean is shown; error bars represent SEM (n = 4, *p < 0.05, ***p < 0.001).

(C) WT8 control cells and HIF2 α (P-A)² WT8 cells were treated with rapamycin (20 nM) and cultured in media containing 5% of the regular amino acid concentration. The increase in cell number was analyzed after 72 hr. The mean is shown; error bars represent SEM (n = 8, **p < 0.01).

(D) Tumor-volume evolution (Vol) over a 45 day period of SLC7A5-silenced 786-O cells (white squares) and their corresponding control 786-O-shSCR cells (black squares) injected subcutaneously in the dorsal flanks of immunosuppressed severe combined immunodeficiency mice, as detailed in the [Experimental Procedures](#) section. The mean is shown; error bars represent SEM (n = 18, *p < 0.05, **p < 0.01). See also [Figure S4](#).

that this pathway may be especially relevant in the pulmonary response to hypoxia for two reasons: first, the lung exhibits the highest levels of HIF2 α gene expression in rodents (Wiesener et al., 2003), and second, hypoxia promotes proliferative responses in the lung (Brusselmans et al., 2003; Niedenzu et al., 1981). Mice were exposed for 4 days to hypoxic conditions (10% O₂), a widely used experimental protocol for studying pulmonary HIF2 α -dependent biological responses in hypoxia in vivo that lead to HIF2 α protein expression in the lung (Brusselmans et al., 2003). Western blot analysis revealed

in lung tissue revealed that hypoxia-induced mTORC1 was markedly increased in the bronchial epithelium of hypoxic mice (Figure 6B), resulting in a significant increase in the number of rpS6-Ser^{235/6} positive bronchial epithelial cells (Figure 6B). We then asked whether HIF2 α activation was enough to mimic this localized mTORC1 activation in the lungs. For this purpose, we used adult Vhl^{fl}-UBC-Cre-ER^{T2} mice in which the expression of *Vhl*, a central repressor of HIF activity, can be acutely inactivated (Miró-Murillo et al., 2011), as well as Vhl^{fl}HIF2 α ^{fl}-UBC-Cre-ER^{T2} mice in which *Vhl* and HIF2 α can be simultaneously inactivated

that levels of phosphorylated rpS6 were markedly increased in the lungs of hypoxic mice (Figure 6A). Moreover, hypoxia resulted in 4EBP1 activation, as demonstrated by the increased in phospho-4EBP1 levels assessed with the anti-p4EBP1^{Ser65} and p4EBP1^{Thr37/46} antibodies, preferentially in the upper band when p4EBP1^{Thr37/46} antibody was used (Figure 6A). An rpS6-Ser^{235/6} immunostaining to localize mTORC1 activation

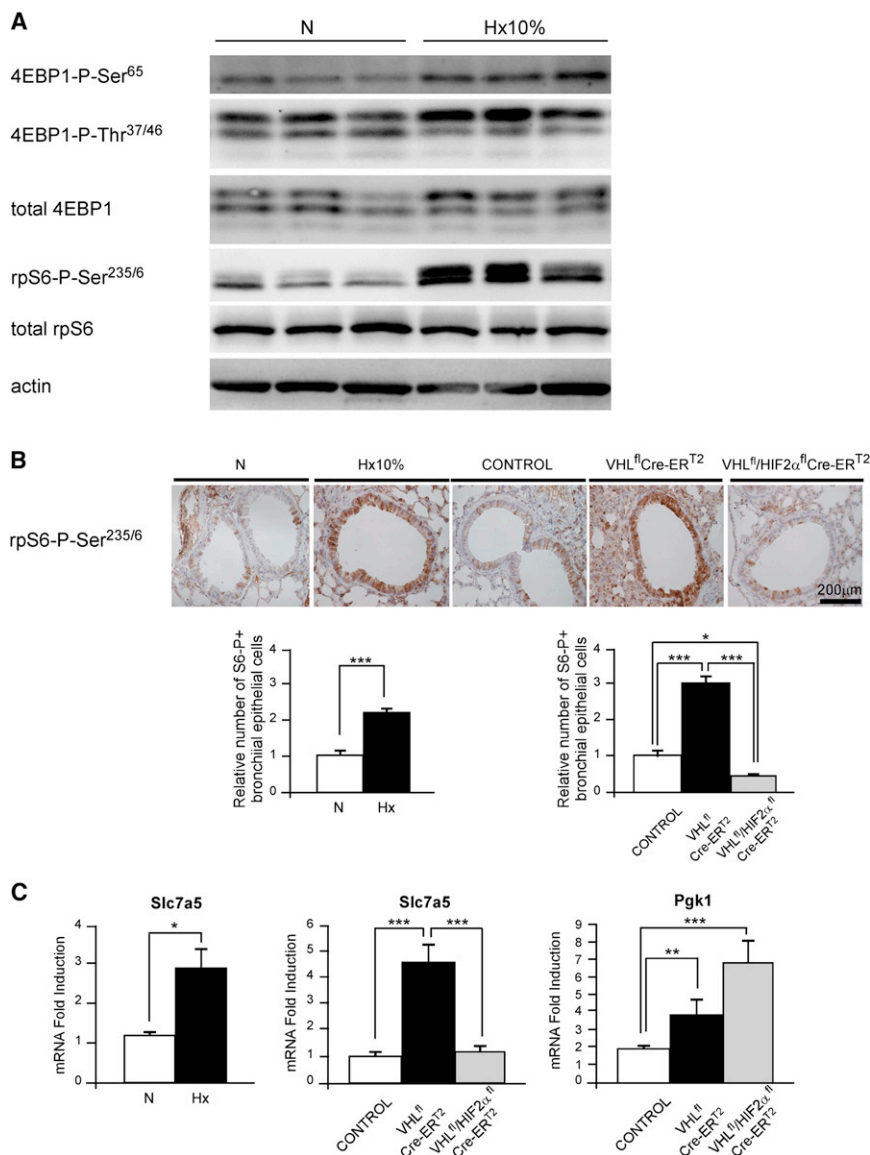


Figure 6. Hypoxia and HIF2 α -Dependent mTORC1 Activity and *Slc7a5* Expression in Lung Tissue

(A) Wild-type mice were exposed to hypoxia (10% O₂) (Hx10%) or normoxia (N) for 4 days. Protein extracts from the lungs were analyzed by western blots with antibodies as shown.

(B) Lung phospho-rpS6^{Ser235/6} immunostaining of mice exposed to normoxia or hypoxia (10% O₂) for 4 days and in Vhl^{fl}-UBC-Cre-ER^{T2}, Vhl^{fl}HIF2 α ^{fl}-UBC-Cre-ER^{T2}, and the corresponding control mice. Quantification of the number of bronchial epithelial cells positive for phospho-rpS6^{Ser235/6} staining in wild-type mice exposed to hypoxia (n = 4) or normoxia (n = 4) as well as Vhl^{fl}-UBC-Cre-ER^{T2} (n = 4), Vhl^{fl}HIF2 α ^{fl}-UBC-Cre-ER^{T2} (n = 4), and the corresponding control mice (n = 3). Five airways were analyzed for each animal, and >1500 cells were analyzed for each group.

(C) Relative expression of *Slc7a5* gene in the lungs of normoxic (n = 7) and hypoxic mice (n = 6), and *Slc7a5* and *Pdk1* in Vhl^{fl}-UBC-Cre-ER^{T2} mice (n = 5), Vhl^{fl}HIF2 α ^{fl}-UBC-Cre-ER^{T2} mice (n = 5), and the corresponding controls (n = 6).

See also Figure S5. For (B) and (C), the mean is shown, and error bars represent SEM (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001).

that elevation of phosphoglycerate kinase 1 (*Pgk1*), a well-recognized HIF1 α -dependent gene in vivo (Rankin et al., 2007), was not reduced in Vhl^{fl}HIF2 α ^{fl}-UBC-Cre-ER^{T2} mice (Figure 6C). These data indicate that low-oxygen tension as well as HIF2 α induction drive mTORC1 activation and increased *Slc7a5* expression in lung tissue and, importantly, define a hypoxic setting triggering mTORC1 activation.

Constitutive HIF2 α activation has also been associated with signs of cell proliferation in liver tissue in vivo (Kim et al.,

Figure S5A). Indeed, HIF2 α protein levels were markedly elevated in the lungs of Vhl^{fl}-UBC-Cre-ER^{T2} mice, but not Vhl^{fl}HIF2 α ^{fl}-UBC-Cre-ER^{T2} mice (Figure S5B). HIF1 α protein levels were induced in both Vhl^{fl}-UBC-Cre-ER^{T2} and Vhl^{fl}HIF2 α ^{fl}-UBC-Cre-ER^{T2} mice (Figure S5B). Importantly, the localized hypoxia-induced mTORC1 activation in bronchial epithelium was nicely mimicked when HIF2 α was activated in the lung (Figure 6B). Indeed, the number of rpS6-Ser^{235/6} positive bronchial epithelial cells was increased in the lungs of Vhl^{fl}-UBC-Cre-ER^{T2} mice, and this effect was dependent on HIF2 α because it was not observed when *Vhl* and *HIF2 α* were simultaneously inactivated in the Vhl^{fl}HIF2 α ^{fl}-UBC-Cre-ER^{T2} mice (Figure 6B). A further analysis showed that *Slc7a5* gene expression was markedly induced in the lungs of mice exposed to low-oxygen tension, as well as upon *Vhl* gene inactivation in Vhl^{fl}-UBC-Cre-ER^{T2} mice, but not in Vhl^{fl}HIF2 α ^{fl}-UBC-Cre-ER^{T2} mice (Figure 6C). This effect on *Slc7a5* gene expression was specific, in

2006). We then investigated whether HIF2 α also drives mTORC1 activation in the liver. Upon *Vhl* gene inactivation in Vhl^{fl}-UBC-Cre-ER^{T2} mice, HIF2 α was elevated in the liver, whereas HIF1 α was more modestly induced (Figure 7A). As expected, when *Vhl* and *HIF2 α* were inactivated simultaneously in Vhl^{fl}HIF2 α ^{fl}-UBC-Cre-ER^{T2} mice (Figure S6A), HIF2 α protein levels were undetectable, whereas modest HIF1 α expression was still present (Figure 7A). Western blot analysis showed that both 4EBP1 and p70-S6K phosphorylation levels were induced in Vhl^{fl}-UBC-Cre-ER^{T2} mice, but not in Vhl^{fl}HIF2 α ^{fl}-UBC-Cre-ER^{T2} mice (Figure 7A), demonstrating the role of HIF2 α in the activation of the mTORC1 pathway in the liver. A more detailed analysis in hepatocytes showed that basal hepatocyte rpS6-Ser^{235/6} and SLC7A5 signal intensities were increased upon *Vhl* gene inactivation, and this increase was markedly suppressed when *Vhl* and *HIF2 α* were simultaneously inactivated (Figures S6B and 7B). In a parallel analysis, *Slc7a5* gene expression, as well as

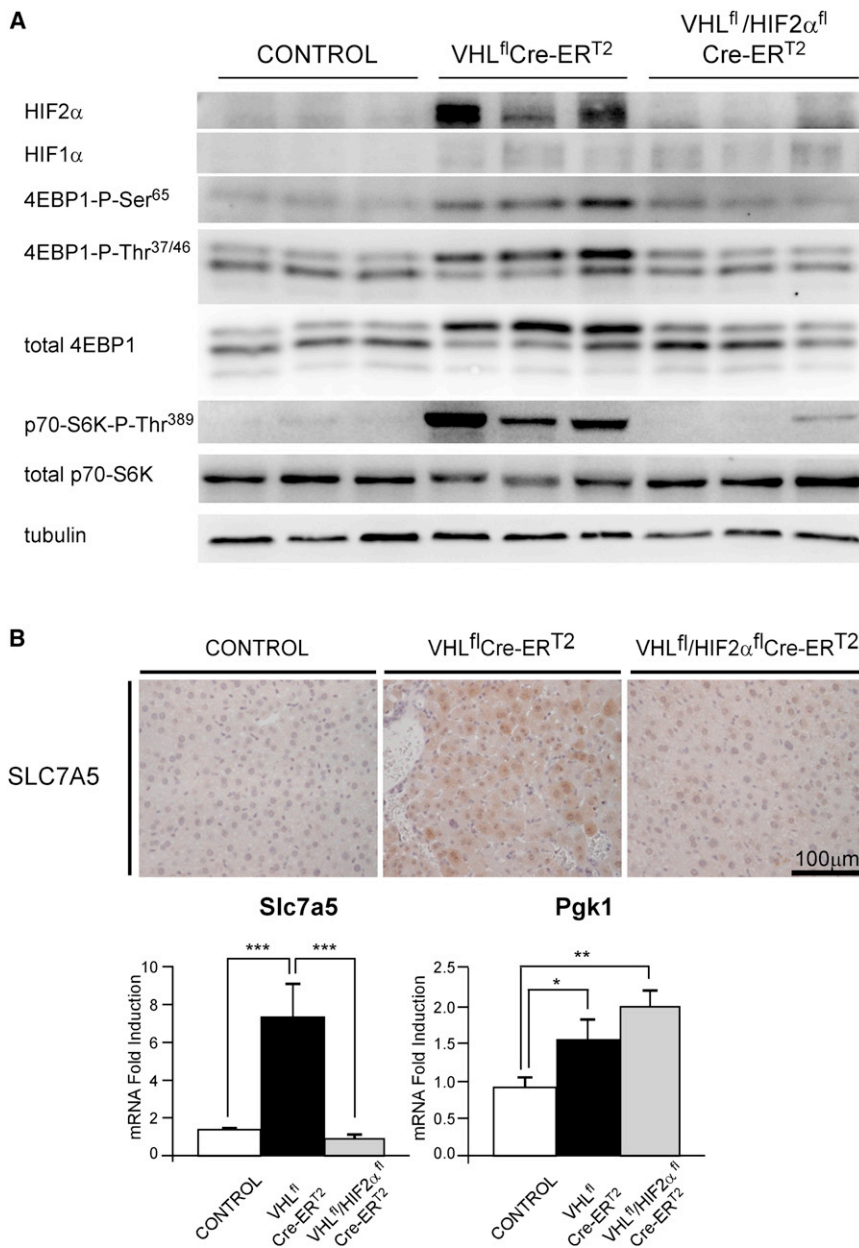


Figure 7. HIF2 α -Dependent mTORC1 Activity and SLC7A5 Expression in VHL-Deficient Liver Tissue

(A) Protein extracts from the livers of Vhl^{fl}-UBC-Cre-ER^{T2}, Vhl^{fl}HIF2 α ^{fl}-UBC-Cre-ER^{T2}, and the corresponding control mice were analyzed by western blots with the indicated antibodies.

(B) SLC7A5 immunostaining of liver tissue (hepatocytes) from Vhl^{fl}-UBC-Cre-ER^{T2}, Vhl^{fl}HIF2 α ^{fl}-UBC-Cre-ER^{T2}, and corresponding control mice. Relative expression of *Slc7a5* and *Pgk1* genes in the livers of Vhl^{fl}-UBC-Cre-ER^{T2} (n = 7), Vhl^{fl}HIF2 α ^{fl}-UBC-Cre-ER^{T2} (n = 6), and corresponding control mice (n = 7).

The mean is shown; error bars represent SEM (*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001). See also Figure S6.

DISCUSSION

Cell-autonomous proliferation can be repressed when oxygen is scarce, limiting energy-consuming processes through HIF-dependent or -independent pathways (Koshiji et al., 2004; Liu et al., 2006). Conversely, the HIF2 α isoform has emerged as a proliferation-promoting factor in VHL-deficient tumor cells, although the underlying molecular mechanisms and the nontumoral scenarios in which this occurs remain poorly understood (Gordan et al., 2007; Gordan et al., 2008; Shen et al., 2011). Here we show that HIF2 α acts as a potent mTORC1 activator via the amino acid carrier *Slc7a5*, a HIF2-dependent gene, thus describing a molecular basis for the proliferation- and tumor-promoting properties of HIF2 α in VHL-deficient cells (see the model in Figure S7).

Previous studies have established that hypoxia represses mTORC1 activity via both HIF1-dependent and HIF-independent pathways (Brugarolas et al., 2004; Liu et al., 2006). Remarkably, our present

study reveals an opposite effect of HIF2 α , which promotes mTORC1 activation via SLC7A5. Importantly, we found that in mice, HIF2 α activation (upon *Vhl* gene inactivation) or hypoxia exposure (10% O₂) lead to mTORC1 activation in lung tissue without the apparent competition of the aforementioned HIF1-dependent and -independent mTORC1 inhibitory responses. Moreover, this mTORC1 activation upon HIF2 α induction in lung tissue, as well as in liver tissue, takes place with a concomitant HIF1 α activation. These observations suggest that mTORC1 activation via the HIF2 α -SLC7A5 pathway overrides other possible pathways mediating hypoxia-induced mTORC1 inhibition that could be executed simultaneously in lungs or livers. Previous studies have shown that the HIF1 α -REDD1 pathway does not lead to mTORC1 inhibition in certain tissues,

that of the HIF1 α -dependent gene *Pgk1*, was elevated upon *Vhl* gene inactivation (Figure 7B). In Vhl^{fl}HIF2 α ^{fl}-UBC-Cre-ER^{T2} mice, this elevation of *Slc7a5* expression was impaired, whereas *Pgk1* gene expression was not repressed (Figure 7B). Taken together, these findings indicate that HIF2 α activation also increases mTORC1 activity and SLC7A5 expression in liver tissue, demonstrating therefore that this HIF2 α -dependent pathway is present in different relevant physiological scenarios.

Our data indicate that HIF2 α drives mTORC1 activity and SLC7A5 expression in different tumoral and nontumoral scenarios and, importantly, define the hypoxic lung as a relevant physiological context leading to hypoxia-induced mTORC1 activation instead of mTORC1 inhibition, as occurs in other hypoxic settings.

Our data indicate that HIF2 α drives mTORC1 activity and SLC7A5 expression in different tumoral and nontumoral scenarios and, importantly, define the hypoxic lung as a relevant physiological context leading to hypoxia-induced mTORC1 activation instead of mTORC1 inhibition, as occurs in other hypoxic settings.

including the liver (Wolff et al., 2011) and possibly also including the lung tissue, in line with our findings. This may explain why mTORC1 activation is observed in the liver and lung upon *Vhl* gene inactivation despite the observed parallel induction of HIF1 α activity in *Vhl*^{fl}-UBC-Cre-ER^{T2} mice. Taken together, the contrasting effects of the different oxygen-sensing pathways on mTORC1 activity indicate that hypoxia can drive mTORC1 activation or inhibition depending on the cell type or tissue and possibly also on the severity and duration of hypoxic challenge, among other variables. Another context in which the HIF2-SLC7A5 pathway is operative is in VHL-deficient renal cell carcinoma cells, in which expression of the HIF2 α isoform is constitutively elevated and critical for the progression of these carcinomas. Importantly, HIF2 α is activated in normoxic conditions in these cells, and thus HIF2 α -dependent mTORC1 activation cannot be counteracted by the HIF1-dependent and HIF-independent pathways that repress mTORC1. In addition, a recent study reported that mTORC1 activity is not affected by REDD1 in VHL-deficient 786-O renal cell carcinoma cells (Kucejova et al., 2011). This study is in line with our observations showing that HIF1 α does not repress mTORC1 in WT8 cells, as described here for HIF1 α (P-A)² WT8 cells.

When discussing the mechanisms by which HIF2 α exerts its protumoral activities in these cells, it should be noted that silencing of endogenous HIF2 α in VHL-deficient cells, such as 786-O cells, markedly suppresses their tumor growth capability without altering their *in vitro* cell proliferation in normal culture media (Kondo et al., 2003; Raval et al., 2005). These observations indicate that HIF2 α favors renal cell carcinoma cell proliferation in the tumor microenvironment. Silencing of SLC7A5 expression in 786-O cells also results in a marked suppression of their xenograft growth capability, whereas cell proliferation is unchanged when cells are cultured in normal culture media (data not shown). HIF2 α -dependent SLC7A5 expression is therefore critical for the proliferation of 786-O cells in the intratumoral context. Indeed, our findings demonstrate that the HIF2 α -induced cell proliferation advantage, via SLC7A5, occurs when amino acid availability is more limited than in normal *in vitro* cell culture conditions, a situation thought to mimic the environment of the inner core of tumors (Marjon et al., 2004). In light of the biological significance of SLC7A5 as an amino acid carrier, our findings indicate that the HIF2 α -SLC7A5-mTORC1 pathway is not a limiting factor when extracellular amino acid supply is abundant, yet it is essential for preserving mTORC1 activity when amino acid supply is reduced. Moreover, it should be noted that the amino acid levels encountered *in vivo* by normal cells such as bronchial epithelial cells and hepatocytes may also be limiting when compared with those of normal culture media. Accordingly, these cells would also require the induction of SLC7A5 via HIF2 α to accelerate amino-acid-dependent mTORC1 activation.

Our data show that SLC7A5 expression is induced in human samples of VHL-deficient CCRCCs. Previous studies reported that HIF2 α is present in all CCRCCs analyzed (Gordan et al., 2008), and therefore SLC7A5 regulation can occur as soon as CCRCCs express HIF2 α , considering that *Slc7a5* is a direct HIF2 α target gene. Expression of the amino acid transporter SLC7A5 is upregulated in numerous human cancers and is impli-

cated in the growth and survival of several cancer cell lines (reviewed in Fuchs and Bode, 2005). However, the molecular mechanisms that regulate this carrier remain largely unknown. Here, we describe a molecular mechanism that regulates *Slc7a5* transcription, identifying *Slc7a5* as a HIF2-responsive gene. Our analysis shows that the binding of HIF2 α to the proximal promoter of the *Slc7a5* gene is specific because it is not observed when HIF1 α is constitutively present in HIF1 α (P-A)² WT8 cells. Further investigation will be required for understanding how the *Slc7a5* proximal promoter specifically favors the binding of the HIF2 α isoform.

In summary, we describe a link between HIF pathways and mTORC1 activation involving the HIF2 α -SLC7A5-mTORC1 axis, thus providing a molecular basis for the proliferation- and tumor-promoting properties of HIF2 α . Moreover, we define relevant physiological scenarios, including those that occur in lung and liver tissue, in which HIF2 α drives mTORC1 activation, in contrast to other hypoxic pathways that lead to mTORC1 inhibition.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cells and Reagents

Retroviral vectors encoding HIF2 α (P-A)², HIF2 α (P-A)²bHLH^{*}, and HIF1 α (P-A)² were used to generate stable transfectants in WT8 cells (see Supplemental Information). WT8 cells infected with the pBABE empty vector were used as WT8 control cells. Retroviral vectors pRV-VHL and pRV control were also used to generate stable transfectants in 786-O-pRV (control 786-O cells) and 786-O-pRV-VHL (786-O-VHL cells) (Kondo et al., 2003).

SLC7A5 (sc-62555-V) and control (sc-108080) small hairpin RNA (shRNA) lentiviral particles (from Santa Cruz Biotechnology) were used to generate stable transfectants in the 786-O cells, 786-O-shSLC7A5 cells, and their corresponding control 786-O-shSCR cells. All cells were maintained in RPMI 1640 with GlutaMAX-I (GIBCO) supplemented with 100 units/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin, and 10% fetal bovine serum (FBS, CultiGrowth). To prepare medium with lower amino acid content, normal RPMI media was diluted with the corresponding volume of amino-acid-free RPMI. Mediums with reduced content of essential amino acids and glutamine were prepared by adding the corresponding volumes of both essential and nonessential amino acids to amino-acid-free RPMI. All amino-acid-depleted mediums were supplemented with 10% dialyzed FBS (Sigma-Aldrich). Cells were routinely cultured in 21% O₂ and 5% CO₂ (normoxic conditions). Rapamycin was purchased from Sigma-Aldrich.

Mice

Vhl^{fl}-UBC-Cre-ER^{T2} mice and gene inactivation by exposure to tamoxifen diet were described previously (Miró-Murillo et al., 2011). *Vhl*^{fl}HIF2 α ^{fl}-UBC-Cre-ER^{T2} mice were generated through the appropriate crosses using Epas1tm1Mcs/J mice (Jackson Laboratories, stock no. 008407). To induce hypoxia *in vivo*, mice were placed in an airtight chamber with inflow and outflow valves, which was infused with a mixture of 10% O₂ and 90% N₂ (Carbueros Metálicos).

Ethics Statements

All mouse experimental procedures were approved by the research ethics committee at the UAM (Autonomous University of Madrid) and were carried out under the supervision of the Head of Animal Welfare and Health at the UAM, in accordance with Spanish and European guidelines (B.O.E., 18 March 1988, and 86/609/EEC European Council Directives).

Fresh human samples were obtained from patients diagnosed and surgically treated in the Urology Department of the University Complex of Albacete, under the supervision of the local ethical committee and the pathologist, with the purpose of not interfering in the histological evaluation.

Statistical Analysis

Data were expressed as the mean \pm SEM, and the differences between groups were analyzed using a two-tailed Student's *t* test.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes seven figures and Supplemental Experimental Procedures and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.017>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. Manuel Palacin for scientific advice. We also thank Dr. W.G. Kaelin (Medical Oncology/Molecular and Cellular Department, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston) for providing the vectors encoding the HIF1 α and HIF2 α forms. This work was supported by grants from the Ministerio de Educación y Ciencia (BFU2008-03407/BMC and SAF2011-29716), RECAVA (RD06/0014/0031), CICYT (SAF2007-60592), CAM (SAL0311/2006), and the FP7-Health European Commission grant (282551, EPOCan).

Received: August 24, 2011

Revised: July 2, 2012

Accepted: September 11, 2012

Published online: October 25, 2012

REFERENCES

- Brugarolas, J., Lei, K., Hurley, R.L., Manning, B.D., Reiling, J.H., Hafen, E., Witters, L.A., Ellisen, L.W., and Kaelin, W.G., Jr. (2004). Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev.* 18, 2893–2904.
- Bruick, R.K., and McKnight, S.L. (2001). A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. *Science* 294, 1337–1340.
- Brusselmans, K., Compennolle, V., Tjwa, M., Wiesener, M.S., Maxwell, P.H., Collen, D., and Carmeliet, P. (2003). Heterozygous deficiency of hypoxia-inducible factor-2 α protects mice against pulmonary hypertension and right ventricular dysfunction during prolonged hypoxia. *J. Clin. Invest.* 111, 1519–1527.
- Cam, H., Easton, J.B., High, A., and Houghton, P.J. (2010). mTORC1 signaling under hypoxic conditions is controlled by ATM-dependent phosphorylation of HIF-1 α . *Mol. Cell* 40, 509–520.
- Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J.M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., et al. (1998). Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature* 394, 485–490.
- Covello, K.L., Kehler, J., Yu, H., Gordan, J.D., Arsham, A.M., Hu, C.J., Labosky, P.A., Simon, M.C., and Keith, B. (2006). HIF-2 α regulates Oct-4: effects of hypoxia on stem cell function, embryonic development, and tumor growth. *Genes Dev.* 20, 557–570.
- DeYoung, M.P., Horak, P., Sofer, A., Sgroi, D., and Ellisen, L.W. (2008). Hypoxia regulates TSC1/2-mTOR signaling and tumor suppression through REDD1-mediated 14-3-3 shuttling. *Genes Dev.* 22, 239–251.
- Epstein, A.C., Gleadle, J.M., McNeill, L.A., Hewitson, K.S., O'Rourke, J., Mole, D.R., Mukherji, M., Metzen, E., Wilson, M.I., Dhanda, A., et al. (2001). C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell* 107, 43–54.
- Fuchs, B.C., and Bode, B.P. (2005). Amino acid transporters ASCT2 and LAT1 in cancer: partners in crime? *Semin. Cancer Biol.* 15, 254–266.
- Goda, N., Ryan, H.E., Khadivi, B., McNulty, W., Rickert, R.C., and Johnson, R.S. (2003). Hypoxia-inducible factor 1 α is essential for cell cycle arrest during hypoxia. *Mol. Cell Biol.* 23, 359–369.
- Gordan, J.D., Bertout, J.A., Hu, C.J., Diehl, J.A., and Simon, M.C. (2007). HIF-2 α promotes hypoxic cell proliferation by enhancing c-myc transcriptional activity. *Cancer Cell* 11, 335–347.
- Gordan, J.D., Lal, P., Dondeti, V.R., Letrero, R., Parekh, K.N., Oquendo, C.E., Greenberg, R.A., Flaherty, K.T., Rathmell, W.K., Keith, B., et al. (2008). HIF- α effects on c-Myc distinguish two subtypes of sporadic VHL-deficient clear cell renal carcinoma. *Cancer Cell* 14, 435–446.
- Hara, K., Maruki, Y., Long, X., Yoshino, K., Oshiro, N., Hidayat, S., Tokunaga, C., Avruch, J., and Yonezawa, K. (2002). Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 110, 177–189.
- Ivan, M., Kondo, K., Yang, H., Kim, W., Valiando, J., Ohh, M., Salic, A., Asara, J.M., Lane, W.S., and Kaelin, W.G., Jr. (2001). HIF α targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O₂ sensing. *Science* 292, 464–468.
- Jaakkola, P., Mole, D.R., Tian, Y.M., Wilson, M.I., Gielbert, J., Gaskell, S.J., Kriegsheim, A., Hebestreit, H.F., Mukherji, M., Schofield, C.J., et al. (2001). Targeting of HIF- α to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O₂-regulated prolyl hydroxylation. *Science* 292, 468–472.
- Kim, D.H., Sarbassov, D.D., Ali, S.M., King, J.E., Latek, R.R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., and Sabatini, D.M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* 110, 163–175.
- Kim, W.Y., Safran, M., Buckley, M.R., Ebert, B.L., Glickman, J., Bosenberg, M., Regan, M., and Kaelin, W.G., Jr. (2006). Failure to prolyl hydroxylate hypoxia-inducible factor α phenocopies VHL inactivation in vivo. *EMBO J.* 25, 4650–4662.
- Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, T.P., and Guan, K.L. (2008). Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat. Cell Biol.* 10, 935–945.
- Kondo, K., Ikco, J., Nakamura, E., Lechpammer, M., and Kaelin, W.G., Jr. (2002). Inhibition of HIF is necessary for tumor suppression by the von Hippel-Lindau protein. *Cancer Cell* 1, 237–246.
- Kondo, K., Kim, W.Y., Lechpammer, M., and Kaelin, W.G., Jr. (2003). Inhibition of HIF2 α is sufficient to suppress pVHL-defective tumor growth. *PLoS Biol.* 1, E83.
- Koshiji, M., Kageyama, Y., Pete, E.A., Horikawa, I., Barrett, J.C., and Huang, L.E. (2004). HIF-1 α induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *EMBO J.* 23, 1949–1956.
- Kucejova, B., Peña-Llopis, S., Yamasaki, T., Sivanand, S., Tran, T.A., Alexander, S., Wolff, N.C., Lotan, Y., Xie, X.J., Kabbani, W., et al. (2011). Interplay between pVHL and mTORC1 pathways in clear-cell renal cell carcinoma. *Mol. Cancer Res.* 9, 1255–1265.
- Kwiatkowski, D.J. (2003). Tuberous sclerosis: from tubers to mTOR. *Ann. Hum. Genet.* 67, 87–96.
- Li, Y., Corradetti, M.N., Inoki, K., and Guan, K.L. (2004). TSC2: filling the GAP in the mTOR signaling pathway. *Trends Biochem. Sci.* 29, 32–38.
- Li, Y., Wang, Y., Kim, E., Beemiller, P., Wang, C.Y., Swanson, J., You, M., and Guan, K.L. (2007). Bnip3 mediates the hypoxia-induced inhibition on mammalian target of rapamycin by interacting with Rheb. *J. Biol. Chem.* 282, 35803–35813.
- Liu, L., Cash, T.P., Jones, R.G., Keith, B., Thompson, C.B., and Simon, M.C. (2006). Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. *Mol. Cell* 21, 521–531.
- Ma, X.M., and Blenis, J. (2009). Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 10, 307–318.
- Mandriota, S.J., Turner, K.J., Davies, D.R., Murray, P.G., Morgan, N.V., Sowter, H.M., Wykoff, C.C., Maher, E.R., Harris, A.L., Ratcliffe, P.J., and Maxwell, P.H. (2002). HIF activation identifies early lesions in VHL kidneys: evidence for site-specific tumor suppressor function in the nephron. *Cancer Cell* 1, 459–468.
- Manning, B.D., and Cantley, L.C. (2003). Rheb fills a GAP between TSC and TOR. *Trends Biochem. Sci.* 28, 573–576.
- Marjon, P.L., Bobrovnikova-Marjon, E.V., and Abcouwer, S.F. (2004). Expression of the pro-angiogenic factors vascular endothelial growth factor and interleukin-8/CXCL8 by human breast carcinomas is responsive to nutrient deprivation and endoplasmic reticulum stress. *Mol. Cancer* 3, 4.

- Miró-Murillo, M., Elorza, A., Soro-Arnáiz, I., Albacete-Albacete, L., Ordoñez, A., Balsa, E., Vara-Vega, A., Vázquez, S., Fuertes, E., Fernández-Criado, C., et al. (2011). Acute Vhl gene inactivation induces cardiac HIF-dependent erythropoietin gene expression. *PLoS ONE* 6, e22589.
- Nicklin, P., Bergman, P., Zhang, B., Triantafellow, E., Wang, H., Nyfeler, B., Yang, H., Hild, M., Kung, C., Wilson, C., et al. (2009). Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell* 136, 521–534.
- Niedenzu, C., Grasedyck, K., Voelkel, N.F., Bittmann, S., and Lindner, J. (1981). Proliferation of lung cells in chronically hypoxic rats. An autoradiographic and radiochemical study. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 48, 185–193.
- Rankin, E.B., Bijl, M.P., Liu, Q., Unger, T.L., Rha, J., Johnson, R.S., Simon, M.C., Keith, B., and Haase, V.H. (2007). Hypoxia-inducible factor-2 (HIF-2) regulates hepatic erythropoietin in vivo. *J. Clin. Invest.* 117, 1068–1077.
- Raval, R.R., Lau, K.W., Tran, M.G., Sowter, H.M., Mandriota, S.J., Li, J.L., Pugh, C.W., Maxwell, P.H., Harris, A.L., and Ratcliffe, P.J. (2005). Contrasting properties of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and HIF-2 in von Hippel-Lindau-associated renal cell carcinoma. *Mol. Cell. Biol.* 25, 5675–5686.
- Sancak, Y., Peterson, T.R., Shaul, Y.D., Lindquist, R.A., Thoreen, C.C., Bar-Peled, L., and Sabatini, D.M. (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 320, 1496–1501.
- Schmelzle, T., and Hall, M.N. (2000). TOR, a central controller of cell growth. *Cell* 103, 253–262.
- Shen, C., Beroukhi, R., Schumacher, S.E., Zhou, J., Chang, M., Signoretti, S., and Kaelin, W.G., Jr. (2011). Genetic and functional studies implicate HIF1 α as a 14q kidney cancer suppressor gene. *Cancer Discov.* 1, 222–235.
- Sonenberg, N., and Hinnebusch, A.G. (2009). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136, 731–745.
- Wang, G.L., Jiang, B.H., Rue, E.A., and Semenza, G.L. (1995). Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 5510–5514.
- Wang, X., Campbell, L.E., Miller, C.M., and Proud, C.G. (1998). Amino acid availability regulates p70 S6 kinase and multiple translation factors. *Biochem. J.* 334, 261–267.
- Wiesener, M.S., Jürgensen, J.S., Rosenberger, C., Scholze, C.K., Hörstrup, J.H., Warnecke, C., Mandriota, S., Bechmann, I., Frei, U.A., Pugh, C.W., et al. (2003). Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2 α in distinct cell populations of different organs. *FASEB J.* 17, 271–273.
- Wolff, N.C., Vega-Rubin-de-Celis, S., Xie, X.J., Castrillon, D.H., Kabbani, W., and Brugarolas, J. (2011). Cell-type-dependent regulation of mTORC1 by REDD1 and the tumor suppressors TSC1/TSC2 and LKB1 in response to hypoxia. *Mol. Cell. Biol.* 31, 1870–1884.